

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Versuche zur Isolierung zuckerbindender Proteine
von *Neurospora crassa* durch osmotischen Schock

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Biologie
der Ludwigs-Maximilians-Universität, München

vorgelegt von

Alfons Hack

aus

Arnstorf

1974

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von
März bis Juli 1969 und März 1971 bis September 1973
am Institut für Genetik der Universität München
unter Anleitung von Professor Dr. W. Klingmüller
durchgeführt.



1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Klingmüller

2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Kaudewitz

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Juli 1974

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	1 - 6
MATERIAL UND METHODEN	7 - 16
1. Stamm	7
2. Nährböden	7
3. Chemikalien	7
4. Anzuchtverfahren zur Gewinnung von Konidien	8
5. Herstellen von Konidien suspensionen	8
6. Plattieren von Konidien	9
7. Ankeimen von Konidien	9
8. Osmotischer Schock	10
9. Messung der Zuckeraufnahme	11
10. Gewinnung konzentrierter Schockflüssigkeit	11
11. Bindetests	12
12. Gelchromatographie	13
13. Diskelektrophorese	13
14. Bestimmung von Enzymaktivitäten	15
15. Radioaktivitätsbestimmung	15
16. Atmungsmessung	16
17. Statistische Sicherung	16
ERGEBNISSE	17 - 61
I. Ausarbeitung osmotischer Schockverfahren	17
I.1. Osmotischer Schock mit Sucrose	17
I.2. Osmotischer Schock mit Salzlösungen	19
I.2.1. Osmotischer Schock an gekeimten Konidien	19
I.2.2. Osmotischer Schock und Detergensbehandlung an ungekeimten Konidien	21

I.2.3. Osmotischer Schock mit verschiedenen Salzlösungen unter Zusatz von Reagenzien, die Membranproteine in Lösung bringen	22
I.3. Osmotischer Schock mit Sucrose + Brij	25
I.4. Osmotischer Schock mit Mannit und Mercaptoäthanol	26
I.5. Nachweis von Protein in den hyperosmolaren Schocklösungen	27
II. Versuch zur Korrelation von Transportdepression und der Abgabe von Transportprotein	31
II.1. Abgabe von ^{14}C -Sorbose aus geschockten und ungeschockten Konidien	32
II.2. Atmungsmessungen	34
II.2.1. Atmung gekeimter Konidien	35
II.2.2. Atmung ungekeimter Konidien	35
II.2.2.1. Atmung osmotisch geschockter Konidien	35
II.2.2.2. Atmung Triton behandelter Konidien	37
III. Auftrennung und Charakterisierung von Schockproteinen	40
III.1. Gelchromatographische Auftrennung von Schockproteinen	40
III.2. Elektrophoretische Auftrennung von Schockproteinen	42
III.2.1. Vergleichende Auftrennung von Proteinen aus verschiedenen hypoosmolaren Schocklösungen	42
III.2.2. Vergleichende Auftrennung von Proteinen aus verschiedenen hyperosmolaren Schocklösungen	44
III.3. Enzymaktivitäten von Schockproteinen	45
III.4. Nachweis von Isoenzymen der alkalischen Phosphatase	47
IV. Bindeaktivität von Schockprotein für ^{14}C -Glucose	49
IV.1. Nachweis von Bindeaktivität	49
IV.2. Spezifität der Bindeaktivität	53
IV.2.1. Kontrollversuche mit denaturierten Schockproteinen	53

IV.2.2. Einfluß von Ionen auf die Bindeaktivität	55
IV.2.3. Kompetitive Hemmversuche	55
IV.3. Versuche zur SH-Gruppenabhängigkeit der Bindeaktivität	57
IV.4. Bindeaktivität fraktionierter Schockproteine	57

DISKUSSION	62 - 68
----------------------	---------

ZUSAMMENFASSUNG	69 - 71
---------------------------	---------

LITERATURVERZEICHNIS	72 - 81
--------------------------------	---------

A. EINLEITUNG

Alle lebenden Zellen, sowohl Bakterien, wie auch Pflanzen- und Tierzellen, werden nach außen hin von einer Membran abgegrenzt, die bei höheren Organismen als Plasmalemma oder Cytoplasmamembran bezeichnet wird. Sie bildet eine Barriere, die verhindert, daß in unkontrollierter Weise zelleigene Substanzen nach außen diffundieren und zellfremde Stoffe von außen ins Zellinnere gelangen. Andererseits gewährleistet gerade diese Membran, daß solche Stoffe, die als Nähr- und Baustoffe für die verschiedenen Lebensfunktionen der Zelle nötig sind, aufgenommen werden können. Diese Aufnahme erfolgt in selektiver Weise durch katalysierte Diffusion oder aktiven Transport.

Zum Studium von Transportvorgängen bei höheren Organismen eignet sich der Schimmelpilz *Neurospora crassa* in besonderem Masse, denn einerseits gehört er zu den biochemisch und genetisch best untersuchten biologischen Objekten und andererseits können bei ihm die Vorteile mikrobiologischer Arbeitstechniken genützt werden.

Es wurden bei *Neurospora* auch bereits eine Anzahl verschiedener Transportsysteme nachgewiesen, u.a. solche für die Zucker Glucose und Sorbose (Klingmüller, 1967 a, b, c; Scarborough, 1970), solche für die verschiedenen Aminosäuren (Pall, 1970; Sweeny et al., 1970; Wolfingbarger et al., 1971), sowie für Phosphat-, Sulfat- und Natriumionen (Marzluff, 1970; Slayman, 1970; Slayman & Slayman, 1970; Lowendorf, 1972).

Wie komplex Regulation und Funktion von Transportsystemen gestaltet sein können, zeigt sich am Beispiel von Glucose und Sorbose. Glucose kann auf verschiedene Weise aufgenommen werden, und zwar einmal durch ein aktives Transportsystem mit hoher Affinität zu diesem Zucker ($K_m = 50 \mu M$). Es ist nachgewiesen in frisch geernteten Konidien, sowie in Konidien, die in Fructoselösungen oder in Glucoselösungen niedriger Konzentration (1 mM) angekeimt wurden (Scarborough, 1970; Klingmüller & Huh, 1972). Dieses System transportiert, wie Scarborough zeigen konnte, neben Glucose auch noch Sorbose. Es muß demnach als Glucose-Sorbose Transportsystem bezeichnet werden. Zellen, die in höheren Glucosekonzentrationen (0,1 M) keimen, reprimieren dieses System; sie können aber Glucose noch mittels katalysierter Diffusion aufnehmen ($K_m = 8 \text{ mM}$). Werden reprimierte Zellen in Glucose freies Medium überführt, so bilden sie wieder das erstgenannte, hochaffine Transportsystem (Scarborough, 1970).

Katalysierte Diffusion und aktiver Transport zeichnen sich durch Charakteristika aus, wie sie i.a. auch für die enzymatische Katalyse gelten: Substratspezifität, Stereospezifität, Sättigungskinetik und Induzierbarkeit. Es darf daher angenommen werden, daß sie ebenso wie diese durch bestimmte Proteine gesteuert werden; derartige Proteine wären demnach die wesentlichen Bestandteile solcher Transportsysteme.

Da die früheren biochemischen Untersuchungen über die Aufnahme von Glucose und Sorbose keine definitive Aussage über Anzahl und Art der an den betreffenden Transportprozessen beteiligten Proteine gestatteten, versuchte Klingmüller auf genetischem Wege eine weitere Klärung herbeizuführen. Mit Hilfe

verschiedener Transportdefektmutanten (Klingmüller, 1967 a) konnte er mindestens drei Strukturgene und ein Regulatorgen dem Glucose-Sorbose Transportsystem zuordnen (Klingmüller et al., 1970). Für das Zusammenwirken der Strukturgene wurde ein Deutungsvorschlag gegeben, der die Funktion verschiedener Isopermeasen postuliert (Klingmüller, 1967 d), der aber mit genetischen Methoden nicht endgültig gesichert werden konnte. Es wurden dadurch vielmehr erneut biochemische Untersuchungen notwendig.

Unter der Voraussetzung, daß die drei Strukturgene Proteine spezifizieren, welche Bestandteile des Transportsystems und als solche im Plasmalemma lokalisiert sind, müßten zur Isolierung dieser Proteine Verfahren angewendet werden, mit denen Membranproteine gewonnen werden können. Um sie später auch funktionell prüfen zu können, muß die Isolierung in möglichst schonender Weise geschehen. Ein naheliegender Weg wäre, die Zellen aufzuschließen und die Cytoplasmamembran mittels differentieller Zentrifugation von allen übrigen Zellbestandteilen abzutrennen. Man könnte dann versuchen, aus derart gereinigten Membranen die interessierenden Bestandteile zu extrahieren. Da jedoch bei den meisten Extraktionsverfahren die Gefahr besteht, daß die Proteine denaturiert werden (Razin, 1972), scheint dieser Weg zur Darstellung der gesuchten Proteine in nativer Form nur bedingt brauchbar.

Eine ganz andere diesbezügliche Methode wurde vor mehreren Jahren bei Bakterien entwickelt: der osmotische Schock. Dabei werden exponentiell wachsende Zellen in einer Lösung aus 20% Sucrose + $1 \cdot 10^{-4}$ M EDTA inkubiert und hieraus in eine

$5 \cdot 10^{-4}$ M MgCl_2 -Lösung überführt. In diese hypoosmolare Lösung werden aus den geschockten Zellen Proteine abgegeben (Neu & Heppel, 1965). Die Analyse dieses Proteingemisches ergab, daß es sich aus einer Anzahl verschiedener Membranproteine zusammensetzt. Cytoplasmatische Proteine fehlen, so daß sich deren Abtrennung erübrigt.

Den osmotischen Schock zeichnet also aus, daß er methodisch und technisch einfach auszuführen ist und selektiv aus der Zellmembran Proteine in Lösung bringt, ohne daß dazu Reagenzien verwendet werden müssen, die diese denaturieren könnten. Er wurde daher bei Bakterien zum bevorzugten Verfahren für die Isolierung von Transportproteinen. Eine Literaturübersicht findet sich bei Boos & Gordon (1971).

Zum Nachweis von Transportproteinen wird wie bei Enzymen ihre Funktion ausgenützt. Diese besteht darin, daß sie bestimmte Substrate - Aminosäuren, Zucker oder anorganische Ionen - durch die Cytoplasmamembran ins Zellinnere schleusen. Dabei erfolgt in den meisten Fällen keine spezifische Umsetzung des Substrates, sondern nur eine spezifische Bindung des zu transportierenden Moleküls an das Protein. Diese Protein - Substrat Bindung kann in geeigneten Testansätzen auch in vitro gemessen werden. Transportproteine mit solcher Bindefunktion werden als Bindeproteine bezeichnet.

Zur Isolierung von Proteinen des Glucose-Sorbose Transportsystems aus Neurosporazellen bot sich zunächst das Schockverfahren von Neu & Heppel an. Es war aber zu berücksichtigen, daß es sich nicht in gleicher Weise für die Isolierung

sämtlicher Transportsysteme eignet. Schon einige Transportsysteme von *Escherichia coli* werden davon kaum angegriffen (Anraku, 1971). Auch die Ergebnisse, die bei höheren Organismen bisher erzielt wurden, waren wenig befriedigend. Schwencke et al. (1970) fanden dieses Schockverfahren bei *Saccharomyces cerevisiae* unwirksam und Patching & Rose (1971) konnten selbst mit einem modifizierten Verfahren von den bekannten Membranenzymen nur einige in geringen Ausbeuten erhalten. Wiley (1970) isolierte bei *Neurospora crassa* mit dem Verfahren von Neu & Heppel zwar ein Tryptophan Bindeprotein, doch war außer diesem Protein in der Schockflüssigkeit nur noch eine Proteinfraction mit alkalischer Phosphataseaktivität nachweisbar; Komponenten des Glucose-Sorbose Transportsystems fehlten völlig (Schneider & Wiley, pers. Mitteilung). Deren Isolierung erschien daher prinzipiell mit größeren Schwierigkeiten verbunden.

Die Aufgabenstellung, die sich daraus ergab, war daher zunächst, Schockverfahren für *Neurospora* (Konidien und Hyphen) zu erarbeiten, die die Abtrennung eines möglichst hohen Proteinanteils aus dem Plasmalemma bewirken. Falls dabei auch die gesuchten Transportproteine aus den Zellen abgegeben werden, müßte bei den geschockten Zellen eine verminderte Aufnahme von Glucose oder Sorbose meßbar sein. Nur Schockverfahren, die einen derartigen Effekt auslösen, schienen daher für die Isolierung von Transportproteinen geeignet. Für Schockverfahren, mit denen in hoher Ausbeute Protein erhalten werden kann, und deren Anwendung zu einer drastischen Senkung der Zuckeraufnahme führt, sollte sodann

in weiteren Versuchen die Zusammensetzung der Schockproteine geprüft und Aufschluß über das Vorliegen möglicher Komponenten des Glucose-Sorbose Transportsystems erhalten werden.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Stamm:

Neurospora crassa, Wildtyp 74 - OR 23 - 1A De Serres;

Herkunft: Dr. Mary E. Case, Yale University.

2. Nährböden:

2.1. Vollmedium:

20 ml Vogels Minimal (vgl. 2.3.) / 980 ml H_2O ,

10 ml Glycerin, 2,5 g Yeast Extract, 1 g Casamino Acids,

10 ml Vitaminlösung und 1,5% Difco-Bacto Agar.

2.2. GFS-Vollmedium:

Wie 2.1. plus 1% Sorbose, 0,05% Fructose und 0,05%

Glucose anstelle von Glycerin

2.3. Vogels Minimalmedium (50 fach):

In 750 ml H_2O werden gelöst: 150 g Na_3 -Citrat $\cdot$ 5,5 H_2O ,

250 g KH_2PO_4 , 100 g NH_4NO_3 , 10 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$,

5 g $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$, Spurenelemente und Biotin (nach

Vogel, 1956)

Zum osmotischen Schock wurde Vogels Minimal ohne Biotin
und ohne Spurenelemente verwendet.

2.4. Fries Minimal (4 fach):

In 1 l H_2O werden gelöst: 20 g NH_4 -Tartat, 4 g NH_4NO_3 ,

4 g KH_2PO_4 , 2 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,4 g NaCl, 0,56 g

$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$, Spurenelemente und Biotin (nach Beadle

& Tatum, 1941)

3. Chemikalien:

Cycloheximid (= Actidion), Detergentien sowie die

Reagentien für die Diskelktrophorese stammen von der

Fa. Serva, Heidelberg.

Für die Enzymbestimmungen wurden Chemikalien der Fa. Boehringer, Mannheim verwendet.

Die Reagenzien für die Scintillationsspektrometrie kamen von der Fa. Packard, Frankfurt (PPO, POPOP und Soluene) und der Fa. Merck, Darmstadt (Toluol).

Folgende radioaktiv markierte Substanzen wurden von "The Radiochemical Centre Amersham, England" bezogen:
D-Glucose- $^{14}\text{C}(\text{U})$, spez. Aktivität: 230 - 250 mCi / mMol;
3-O-Methyl-D-Glucose- $^{14}\text{C}(\text{U})$, spez. Aktivität:
10 - 25 mCi / mMol; L-Sorbose- $^{14}\text{C}(\text{U})$, spez. Aktivität:
2,7 mCi / mMol.

Die übrigen Chemikalien kamen von der Fa. Merck, Darmstadt.

4. Anzuchtverfahren zur Gewinnung von Konidien:

Erlenmeyer-Weithalskolben (300 ml, Schaumstoffkappenverschluß), mit je 50 ml Vollmedium wurden mit Konidien inoculiert und bei 25°C 7 Tage lang bebrütet (= Standardkulturen).

5. Herstellen von Konidiensuspensionen:

Konidien 7 Tage alter Standardkulturen wurden als Staub trocken geerntet, in Wasser suspendiert und zur Entfernung von Mycel durch sterile Watte filtriert. Die Bestimmung der Konidiendichte erfolgte in Hämocytometer oder im Coulter Counter. Es wurden jeweils zwei frische Füllungen ausgezählt. Die Suspension wurde auf $4 \cdot 10^6$ Konidien / ml eingestellt.

6. Plattieren von Konidien:

Ca. $4 \cdot 10^2$ Konidien wurden in 100 ml geschmolzenes GFS-Vollmedium (auf 47°C abgekühlt) gegeben, dieses gut durchmischt und davon 5 Petrischalen gegossen. Nach dreitägiger Bebrütung bei 25°C wurden die makroskopisch sichtbaren Kolonien ausgezählt.

Durch vergleichende Plattierung von osmotisch geschockten und ungeschockten Konidien wurde für die geschockte Population der Anteil ermittelt, der noch zur Koloniebildung befähigt war. Dieser Wert wird im folgenden zur Vereinfachung des Textes als "Überlebensrate" bezeichnet. Es soll damit nicht ausgeschlossen werden, daß ein Teil der Zellen, die bei Plattierung keine makroskopisch sichtbaren Kolonien mehr bilden, nicht wenigstens für einige Zeit nach dem Schock noch gewisse Lebensfunktionen leisteten.

7. Ankeimen von Konidien

7.1. Ankeimen im Fructose-Medium:

In einer Vogels Minimallösung (1:50) mit einem Fructosegehalt von 0,1% wurden die Konidien in einer Konzentration von $4 \cdot 10^6$ / ml bei 25°C incubiert. Um aerobe Bedingungen zu gewährleisten, wurde während des Ankeimens kontinuierlich ein kräftiger Luftstrom durch die Konidien suspension geleitet. Nach einem Zeitraum von 5 h waren 70 - 80% der Konidien gekeimt. Wird statt Fructose 0,1% Sorbose gegeben, so erfolgt keine Keimung.

7.2. Ankeimen im Glucose-Medium:

Die Ankeimung erfolgte analog 7.1., jedoch - entsprechend den Angaben von Schneider & Wiley (1970) - in Fries Mini-

mallösung (1 : 4) plus 2% Glucose.

Zur Derepression des Glucose-Sorbose Transportsystems wurden derart angekeimte Zellen nach gründlichem Waschen für 2 h in ein Hungermedium überführt. Es bestand aus Fries Minimallösung (1 : 4) ohne Zusatz einer Kohlenstoffquelle. Hierin verblieben die Zellen für 2 h unter ständiger Belüftung.

Die Messung der Zuckeraufnahme wurde an 5 h lang angekeimten Konidien durchgeführt, für die Isolierung von Schockproteinen wurden 20 h lang angekeimte Konidien verwendet.

8. Osmotischer Schock:

Aus einer Suspension wurden Konidien auf ein Filter niedergeschlagen und zweimal mit H_2O gewaschen. Anschließend wurden sie mit einem Titer von 10^7 / ml bei $25^\circ C$ in eine hochosmolare Zucker- oder Salzlösung überführt (Konzentrationsangaben im Ergebnisteil): Schritt A des osmotischen Schocks.

Darin verblieben ungekeimte und für 5 h angekeimte Konidien 5 min, 20 h lang angekeimte 15 min.

Danach wurden die Konidien erneut abfiltriert und für eine gleiche Zeit bei $0^\circ C$ in H_2O resuspendiert (bei einigen Versuchen unter Zusatz von $5 \cdot 10^{-4}$ M $MgCl_2$): Schritt B des osmotischen Schocks.

Die nach Entfernen der Konidien erhaltene Lösung wird hier als Schockflüssigkeit bezeichnet. Für weitere Untersuchungen wurden die Konidien anschließend an den Schock in 75 mM Phosphat-Citratpuffer überführt. Zur Trockengewichtsbestimmung wurden Proben abfiltriert und 24 h bei $60^\circ C$ getrocknet.

9. Messung der Zuckeraufnahme:

Um den Einfluß des osmotischen Schocks auf die Zuckeraufnahme zu bestimmen, wurde die Aufnahme sowohl geschockter, als auch ungeschockter Zellen gemessen. Letztere waren ebenso wie die geschockten vorbehandelt, nur daß für Schritt A statt einer hochosmolaren Lösung H_2O verwendet wurde. Geschockte und ungeschockte Konidien wurden in je 100 ml Belüftungsflaschen mit 20 ml 75 mM Phosphat-Citratpuffer (pH 4,75) + 19,6 ml H_2O überführt und 0,4 ml einer Lösung ^{14}C -markierter Zucker zugegeben (Sorbitose im Ansatz 0,01 μCi / ml bzw. 3-O-Methyl-Glucose im Ansatz 0,01 μCi / ml). Die Incubation erfolgte unter Belüftung bei 25°C. In Abständen von 5, 15, 30 und 60 min wurden Proben von 5 ml entnommen, auf Membranfilter niedergeschlagen, zweimal mit H_2O gewaschen, getrocknet und die Filter für die Radioaktivitätsmessung in 5 ml Scintillationsflüssigkeit überführt. Wurde bei geschockten Konidien gegenüber ungeschockten eine Verringerung der Zuckeraufnahme gemessen, so wird dies im folgenden vereinfachend auch als Transportdepression bezeichnet.

10. Gewinnung konzentrierter Schockflüssigkeit:

20 h nach B.7.2. angekeimte und dereprimierte Zellen wurden einem osmotischen Schock unterworfen. Die dabei erhaltene Schockflüssigkeit (in Volumina von 200 bis 2000 ml) wurde über Amicon UM-10 Membranen in gerührten Ultrafiltrationszellen der Fa. Amicon bei einem Druck von höchstens 3 at N_2 eingeeengt. Die maximale Durchflußleistung pro Stunde betrug 2,5 ml / cm² Filterfläche

bei einer Temperatur von 2°C. Nach Konzentrierung der Lösung auf ca. 5 ml wurde diese zweimal mit je 20 ml H₂O gewaschen und anschließend ihr Proteingehalt nach Lowry et al. (1951) bestimmt. Die Ultrafiltrationsmembranen wurden nach eintägiger Behandlung mit 1% Pepsin bei pH 1 und 37°C erneut verwendet.

11. Bindetests:

11.1. Gleichgewichtsdialyse:

79 ml eines 50 mM Tris/HCl Puffers, pH 7,2, + 1 ml ¹⁴C-3-O-Methylglucose ($\pm 1 \mu\text{Ci}$) wurden in ein 100 ml Becherglas gegeben (= Außenmedium). Darin wurde ein Dialyseschlauch (Visking-Dialyseschlauch, Type 8/32, Serva Heidelberg) mit 1 ml der konzentrierten Schockflüssigkeit eingehängt (= Innenmedium) und unter ständigem Rühren 20 h dialysiert. Danach wurden Proben von je 0,2 ml abpipettiert und mit 15 ml Scintillationsflüssigkeit + 0,3 ml H₂O zur Radioaktivitätsmessung gebracht.

11.2. Ultrafiltrationsmethode:

Die Bestimmung von Bindeaktivität nach der Ultrafiltrationsmethode wurde mit einem nach Angaben von Paulus (1969) gebautem Apparat durchgeführt. Hiermit können gleichzeitig und unabhängig voneinander acht verschiedene Proben auf Bindeaktivität getestet werden. Jeder der Testansätze enthielt bei einem Endvolumen von 0,5 ml: 25 mM Tris/HCl Puffer, pH 7,2, 0,5 μCi ¹⁴C-Glucose und 200 μ g Schockproteine. Die Proben wurden auf Amicon UM-10 Membranen mit einem Durchmesser von 10 mm abfiltriert. Danach wurden die Filterunterseiten - noch im Gerät

eingespannt - zunächst zweimal mit je 10 ml H_2O gewaschen. Die Filter wurden dann in Scintillationsgläschen überführt, darin 30 min bei $60^{\circ}C$ getrocknet und anschließend mit je 0,5 ml Soluene versetzt. Die Gläschen wurden gut verschlossen und über Nacht geschüttelt. Nach Zufüllen von 10 ml Scintillationsflüssigkeit erfolgte die Messung der Radioaktivität.

12. Gelchromatographie:

Zur chromatographischen Auftrennung von Schockproteinen fand eine Sephadex G-100 Säule von der Größe $2,6 \cdot 55$ cm Verwendung. Das äußere Volumen dieses Gelkörpers, das mit Blue Dextran 2000 bestimmt wurde, betrug 85 ± 4 cm³. Die Säule wurde mit 0,2 M Tris/HCl Puffer, pH 7,2, äquilibriert, dem zur Vermeidung von Kontaminationen 0,02% NaN_3 zugesetzt wurde. Der Proteinauftrag erfolgte mittels eines Adaptors, der über eine Schlauchpumpe (LKB) beschickt wurde. Pro Trenngang wurden 5 - 7 ml Proteinlösung, entsprechen einem Proteingehalt von 30 - 50 mg, appliziert. Eluiert wurde bei $4^{\circ}C$ mit dem gleichen Puffer, mit dem die Säule äquilibriert war, jedoch ohne Zusatz von NaN_3 . Fraktionsvolumen 40 Tropfen (etwa 2,35 ml). Die Absorption des Eluats bei 280 nm wurde in einem Uvicord (LKB) gemessen und durch einen angeschlossenen Schreiber aufgezeichnet.

13. Diskelektrophorese:

Die Diskelektrophorese wurde nach Maurer (1968) durchgeführt. Die dabei verwendeten Polyacrylamidgele setzten

sich diskontinuierlich, d.h. aus einem Sammel- u. einem Trenngel zusammen. Sie wurden in 140 mm langen Glasröhrchen mit einem Innendurchmesser von 5 mm einpolymerisiert.

Das Sammelgel wurde aus einem Gemisch von folgenden Lösungen bereitet (Angaben pro 100 ml Lösung):

Lösung 1: 5,98 g Trishydroxymethylaminomethan
0,46 ml Tetramethyläthylendiamin
48 ml 1 N HCl

Lösung 2: 10,0 g Acrylamid
2,5 g N,N'Methylenbisacrylamid

Lösung 3: 4,0 mg Riboflavin

Lösung 4: 40 g Sucrose

Die Lösungen wurden in einem Volumenverhältnis von 1 : 2 : 1 : 4 gemischt und davon 0,3 ml / Röhrchen unter UV Licht polymerisiert.

Das Trenngel, das 7,5% Acrylamid enthielt, setzte sich aus folgenden Lösungen zusammen:

Lösung 1: 36,6 g Trishydroxymethylaminomethan
0,23 ml Tetramethyläthylendiamin
48 ml 1 N HCl

Lösung 2: 30,0 g Acrylamid
0,8 g N,N'Methylenbisacrylamid

Lösung 3: 0,14 g Ammoniumperoxodisulfat

Das Mischungsverhältnis betrug 1 : 2 : 4 plus ein Volumenteil H_2O . Pro Röhrchen wurden ca 2,5 ml dieses Trenngelgemisches einpolymerisiert. Der pH Wert des Sammelgels betrug 6,9, der des Trenngels 8,9.

Auf die fertigen Gele wurde je 200 μ Schockprotein auf-

gebracht und die Elektrophorese in einem Tris/Glycin Puffer vom pH 8,3 (0,6 g Tris und 2,8 g Glycin in 100 ml H₂O) unter ständiger Kühlung bei etwa 4°C durchgeführt. Die angelegte Stromstärke betrug maximal 5 mA / Gel. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele vorsichtig aus dem Glasröhrchen herausgelöst und - soweit nicht anders angegeben - für eine Stunde in einer Lösung von 1% Amidoschwarz in 7%iger Essigsäure angefärbt. Überschüssiger, d.h. nicht an Proteine gebundener Farbstoff wurde durch Einlegen der gefärbten Gele in 7%ige Essigsäure herausgelöst.

14. Bestimmung von Enzymaktivitäten:

Alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1.) und saure Phosphatase (EC 3.1.3.2.) wurden nach Bergmeyer (1970) bestimmt. ATP-ase (EC 3.6.1.4.) wurde nach Emmelot et al. (1964) gemessen, die Bestimmung von anorganischem Phosphat erfolgte dabei nach Fiske & Subbarow (1925).

β -Fructofuranosidase (EC 3.2.1.24.) wurde nach einer Arbeitsanleitung der Fa. Boehringer (1972) getestet.

Succinat-Dehydrogenase (EC 1.3.99.1.) wurde nach Arrigoni & Singer (1962) bestimmt.

Die erforderlichen Extinctionsmessungen wurden in einem Eppendorf Photometer 1101 oder in einem Beckman Spectrophotometer DB durchgeführt.

15. Radioaktivitätsbestimmung:

Die Radioaktivitätsbestimmung wurde in einem Scintillationszähler der Fa. Packard, Modell 3003 durchgeführt.

Als Scintillationsflüssigkeit diente eine Lösung von 5 g PPO und 0,3 g POPOP in 1 l Toluol (bei wässrigen Proben 0,75 l Toluol + 0,25 l Triton X 100). Die ^{14}C Ausbeute wasserfreier Proben betrug bei 10 ml Scintillationsflüssigkeit 74%.

16. Atmungsmessung:

40 ml einer Konidiensuspension ($4 \cdot 10^6$ Konidien / ml) wurden 5 min zur Sauerstoffsättigung mit einem kräftigen Luftstrom durchquirlt. Danach wurde mit einer Sauerstoffelektrode (Beckman Instruments: Physiological Gas Analyzer, Modell 160, Oxygen Macro Electrode) der Abfall der Sauerstoffpartialdruckes in Abhängigkeit vom zeitlichen Verlauf in der Suspension bei 25°C gemessen. Der Sauerstoffpartialdruck kann in Mol O_2 / Volumeneinheit umgerechnet werden. Damit ist ein direktes Maß für die Atmung der Konidien der Probe gegeben.

17. Statistische Sicherung:

Bei den angegebenen Mutungsgrenzen handelt es sich um den einfachen mittleren Fehler des Mittelwertes.

C. ERGEBNISSE

I Ausarbeitung osmotischer Schockverfahren

Wie einleitend dargelegt, stellte sich als erste Aufgabe die, ein Schockverfahren zu finden, mit welchem aus Neurospora-zellen Proteine in möglichst hoher Ausbeute gewonnen werden können. Als notwendiges, wenn auch allein nicht hinreichendes Kriterium dafür, daß unter ihnen auch Zuckertransportproteine enthalten sind, kann die Verringerung der Zuckeraufnahme geschockter Zellen dienen. Die Aufnahme von Sorbose und Glucose wurde daher begleitend gemessen.

I.1. Osmotischer Schock mit Sucrose

Wiley (1970) hat vorgeschlagen, das Verfahren von Neu & Heppel (1965) durch Erhöhung der Konzentration der Sucrose-lösung in Schritt A des osmotischen Schocks auch bei Neurospora wirksam zu machen. Um zu prüfen, ob sich dadurch tatsächlich ein wirksamer Schock erzielen läßt, wurde folgendermaßen vorgegangen. Je $1,6 \cdot 10^8$ für 5 h in Fructose angekeimte Konidien kamen für 5 min in 40 ml Sucroselösung verschiedener Konzentration (30 - 60%), welche $1 \cdot 10^{-4}$ M EDTA enthielt. Danach wurden die Zellen, wie in B.8. angegeben, durch Überführen in H_2O geschockt und anschließend die ^{14}C -Sorboseaufnahme gemessen. Außerdem wurde die Überlebensrate für jeden Ansatz bestimmt (B.6.). Die Ergebnisse sind in Tab. 1 wiedergegeben.

Es zeigte sich, daß erst ein Schock mit 60%iger Sucroselösung

Tabelle 1

Sucrose- konzentration (%)	A (min)				B
	5	15	30	60	
0	983	2442	4523	8098	379
30	1911	3452	6451	13023	296
40	1208	3003	5719	11733	311
50	856	1899	3855	8851	318
60	629	1356	2714	6659	300

Einfluß eines osmotischen Schocks mit Sucroselösungen unterschiedlicher Konzentration auf Sorboseaufnahme und Überlebensrate von angekeimten Konidien. 5-minütige Einwirkung der Sucroselösung. A: gemessene Radioaktivität in cpm je Probe nach verschiedenen Inkubationszeiten der Zellen mit ^{14}C -Sorbose (Membranfiltertechnik). B: Gefundene Kolonien nach Plattierung von je 400 Zellen.

eine geringfügige Verminderung der Sorboseaufnahme bewirkt, der Schock aus niedrigeren Sucrosekonzentrationen aber sogar eine Steigerung. Die Überlebensraten sind demgegenüber für alle geschockten Populationen im Vergleich zu der nicht geschockten Kontrolle vermindert. Dieses Verfahren erweist sich demnach - gemessen an den vorher aufgestellten Kriterien - als nicht geeignet für weitere Untersuchungen.

Auf die hier beobachtete Steigerung der Sorboseaufnahme wird in der Diskussion eingegangen.

I.2. Osmotischer Schock mit Salzlösungen

Der osmotische Schock mit Sucroselösungen ist, wie soeben gezeigt wurde, bei Konidien von *Neurospora* im Gegensatz zu Befunden an Bakterien, nicht effektiv. Bei der Suche nach anderen Möglichkeiten fiel die Wahl auf Salzlösungen. Denn einerseits können mit Salzlösungen höhere Osmolaritäten erreicht werden als mit Zuckerlösungen, andererseits wird durch ihre Verwendung im Verlauf des osmotischen Schocks eine Variierung der Ionenkonzentration an der Membran erzwungen. Dadurch können aber Proteine zum Ablösen von der Membran veranlaßt werden (Razin, 1972). Als Salzlösung mit hoher Osmolarität und physiologischer Zusammensetzung bietet sich die konzentrierte Minimallösung nach Vogels (1956) an.

I.2.1. Osmotischer Schock an gekeimten Konidien

Werden in Fructose angekeimte Konidien mit der Salzlösung nach Vogels geschockt, so läßt sich gegenüber ungeschockten Zellen eine Depression des ^{14}C -Sorbosetransportes nachweisen. Der Aktivitätsanstieg in den Zellen wurde nach B.9. während des Zeitraumes von einer Stunde verfolgt. In den geschockten Zellen blieb er gegenüber der Kontrolle um $62 \pm 3\%$ vermindert (Mittelwert aus 20 Daten, die aus 5 voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen erhalten wurden). Den unterschiedlichen Anstieg der ^{14}C -Aktivität zeigt Abb. 1.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in der Schockflüssigkeit ergab eine Ausbeute von $100 \mu\text{g Protein} / 1 \text{ g Zelltrocken}$

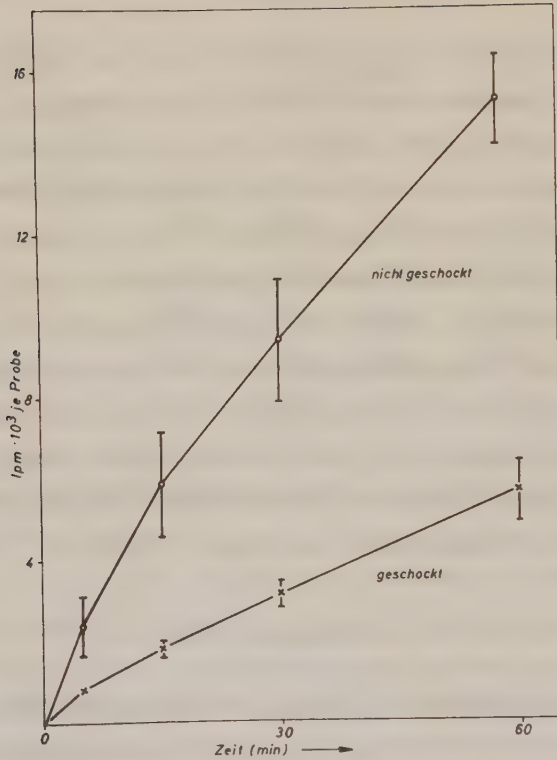


Abb.1. Gemessene Radioaktivität angekeimter Konidien nach bis zu 60 minütiger Incubation bei 25°C mit ^{14}C -Sorbose; $2 \cdot 10^7$ Konidien je Probe; Membranfiltertechnik.

Kreuze: Ansatz von vorher mit unverdünntem Vogels Minimal geschockten Konidien. Kreise: Ansatz mit ungeschockten, aber sonst gleich behandelten Konidien. Dargestellt sind die Mittelwerte und die mittleren Fehler aus den Ergebnissen von 5 voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen.

gewicht (Ultrafiltration mit einer Sartorius SM 12 136 Membran durchgeführt).

Die Anwendung von Vogels Minimallösung gestattet demnach bei *Neurospora* Schockproteine zu isolieren, wenn auch nur in relativ geringer Ausbeute. Ob dieser Schock das Glucose-Sorbose Transportsystem selbst angreift, bzw. Teile davon aus den Zellen herauslöst, ist zunächst offen. Mit einer solchen Annahme stehen zwar die Aufnahmemessungen in Einklang, doch sind indirekte Ursachen für die Transportminderung nicht ausgeschlossen. Sie sollten in einem späteren Teil der Arbeit untersucht werden.

I.2.2. Osmotischer Schock und Detergensbehandlung an ungekeimten Konidien

Bei den bisherigen Schockversuchen kamen Konidien zur Anwendung, welche mit Fructose vorbehandelt und so angekeimt worden waren. Bei Vorbehandlung der Zellen mit Sorbose wird hingegen eine Keimung verhindert (De Serres et al., 1962; Brockman & De Serres, 1963). Trotzdem ist die Sorboseaufnahme solcher Konidien im Vergleich zu nicht vorbehandelten durch Induktion eines eigenen konidialen Transportsystems gesteigert (Teifel, 1971).

Versuche, auch bei solchen Sorbose vorbehandelten Konidien durch osmotischen Schock mit Vogels Minimal die Rate der anschließend gemessenen ^{14}C -Sorboseaufnahme zu verringern, hatten ein negatives Ergebnis. Vermutlich ist die im Vergleich

zur Hyphenwand wesentlich stabilere Konidienwand dafür verantwortlich, daß der osmotische Schock hier nicht wirksam werden kann.

Um dennoch auch eine Abtrennung des durch Sorbosevorbehandlung induzierbaren Transportsystems möglich zu machen, wurde Vogels Minimal in Kombination mit dem Detergens Triton X 100 (2%) verwendet. Dieses kombinierte Verfahren bewirkte eine starke Depression des Sorbosetransportes; sie stellte sich selbst dann noch ein, wenn die verwendete Salzlösung 1 : 10 mit H_2O verdünnt wurde. Auch nach alleiniger Detergensbehandlung ungekeimter Konidien wurde eine Verringerung des Sorbose-transportes erzielt, wenn die Inkubationszeit 30 min betrug.

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, daß auch ungekeimte Konidien osmotisch schockbar sind. Einzelheiten dazu wurden früher publiziert (Hack & Klingmüller, 1971).

I.2.3. Osmotischer Schock mit verschiedenen Salzlösungen unter Zusatz von Reagenzien, die Membranproteine in Lösung bringen

Sowohl die mit gekeimten, wie auch mit ungekeimten Konidien durchgeführten Versuche zeigen also, daß bei Neurospora, in Abweichung der von Neu & Heppel für E. coli ausgearbeiteten Methode, eine Salzlösung von hoher Ionenkonzentration benutzt werden muß, wenn ein Schockeffekt erzielt werden soll. Um die Ausbeute an Protein bei Verwendung von Vogels Minimal zu verbessern, sollte nun in zusätzlichen Versuchen die Wirksamkeit weiterer Reagenzien geprüft werden, von denen bekannt ist,

daß sie die Lösung von Membranproteinen vermitteln können. Hierher gehören EDTA (Reynolds & Trayer, 1971) und Mercapto-äthanol (Schaumburg, 1972). Gleichzeitig wurde der Einfluß der Ionenkonzentration durch Verwendung von KCl verschiedener Molarität getestet. Als Detergens kamen anstelle von Triton die leichter von Proteinen abtrennbaren Detergentien Brij₃₅ und Brij₅₈ zur Anwendung. Die Ergebnisse der entsprechenden Versuchsserie sind in Tab. 2. zusammengefaßt. Es zeigt sich, daß mit allen dort angegebenen Schockverfahren eine gute Ausbeute an Protein erreicht werden konnte. Die Steigerung gegenüber einem alleinigen Schock mit Vogels Minimal (vgl. C.I.2.1.) betrug stets mehr als das zehnfache, bis zum 90 fachen bei dem Schockverfahren mit Vogels Minimal und Brij (Tabelle 2, letzte Spalte). Eine hohe Ionenkonzentration in Schritt A des osmotischen Schocks scheint also die Proteinabgabe zu fördern.

Wie die Messung der Glucoseaufnahme ergab, ist diese bei den mit Vogels und Brij₃₅ bzw. Brij₅₈ geschockten Zellen gegenüber einer ungeschockten Kontrolle auf 10% bzw. 3% abgesunken. Die anschließend ebenfalls gemessenen Überlebensrate dieser Zellen ist durch den osmotischen Schock jedoch ebenfalls stark vermindert: im ersteren Fall bildeten noch 7% der Zellen Kolonien, im zweiten nur noch 2%.

Wie bei ungekeimten Konidien (Hack & Klingmüller, 1971) führt auch bei gekeimten Konidien die Anwesenheit von Detergens in Schritt A des osmotischen Schocks zu einer erhöhten Schädigung der Zellen.

Tabelle 2

Proteinausbeute aus Schritt B des osmotischen Schocks,
bei Verwendung verschiedener hyperosmolarer Medien

Zusammensetzung des Mediums von Schritt A des osmotischen Schocks				Trockengewicht des geschockten Myceis (g)	Gesamtausbeute an Protein (mg)	Protein / 1 g Zelltrockengewicht (mg)
Salzlösung	Detergens	MET	EDTA			
Vogels Minimal	0,3% Brij ₃₅	-	-	0,733	5,717	7,8
Vogels Minimal	0,3% Brij ₅₈	-	-	0,918	8,72	9,5
1,5 M KCl	0,3% Brij ₃₅	-	5 mM	1,26	2,696	2,14
1,5 M KCl	0,3% Brij ₃₅	1 mM	-	1,07	2,35	2,2
1,5 M KCl	-	1 mM	5 mM	0,87	0,818	0,94
0,2 M KCl	0,3% Brij ₃₅	1 mM	5 mM	1,07	1,82	1,7
0,2 M KCl	0,3% Brij ₃₅	1 mM	5 mM	1,09	1,96	1,8

Tab. 2. Proteinausbeute nach osmotischem Schock an 20 h angekeimten und anschließend ausgehungerten Konidien (Titer : $4 \cdot 10^6$ / ml). Osmotischer Schock durch 15 minütiges Incubieren der Zellen in Salzlösungen unter teilweiser Beigabe von Detergens, Mercaptoäthanol (MET) und EDTA und anschließendem raschem Überführen in H_2O . Nach Entfernen der Zellen zur Trockengewichtsbestimmung, Ultrafiltration der erhaltenen Proteinlösung und Bestimmung ihres Proteingehaltes.

I.3. Osmotischer Schock mit Sucrose + Brij

Wenn, wie gezeigt, Zusatz von Detergens die Effektivität des osmotischen Schocks vergrößert, sollte möglicherweise auch der Sucroseschock in Kombination mit einer Detergensbehandlung bei gekeimten Konidien brauchbar sein.

Um dies zu prüfen, wurden in Glucose angekeimte und anschließend dereprimierte Zellen mit 30% Sucroslösung unter Zusatz von 0,3% Brij₃₅ und 10^{-2} M EDTA geschockt. Die so erhaltene Proteinausbeute aus der Schockflüssigkeit betrug 6,2 mg Protein / 1 g Zelltrockengewicht. Die ^{14}C -Glucoseaufnahme der Konidien war nach diesem Schock um 99% vermindert. Desgleichen war auch die durch Plattierungsversuche ermittelte Überlebensrate der Zellen um 99% verringert.

I.4. Osmotischer Schock mit Mannit und Mercaptoäthanol

Bei *Saccharomyces cerevisiae* erwies sich nach Angaben von Schwencke et al. (1970) der bei Bakterien übliche Sucrose-schock ebenfalls als uneffektiv. Diese Autoren ersetzten in Schritt A die Sucrose durch eine Lösung aus 1,5 M Mannit, 1mM Mercaptoäthanol, 0,5 mM EDTA und 0,1 M Tris. Daraus wurden die Zellen in eine 0,5 mM $MgCl_2$ Lösung überführt.

Eigene Versuche an *Neurospora* mit diesem Verfahren ergaben bei Glucose angekeimten, dereprimierten Zellen eine Verringerung der ^{14}C -3-O-Methylglucoseaufnahme um 88% und der Überlebensrate um 67%.

Wird das Verfahren weiterhin dergestalt modifiziert, daß in Schritt B statt der $MgCl_2$ Lösung H_2O verwendet wird (dieses Verfahren wird im folgenden als Mannitverfahren bezeichnet), so läßt sich die Proteinausbeute von vorher 6 mg Protein / 1 g Zelltrockengewicht auf 7,5 mg Protein + 1 g Zelltrockengewicht steigern, während Überlebensrate und ^{14}C -3-O-Methylglucoseaufnahme um etwa die gleichen Beträge wie vorher vermindert werden. Gibt man zusätzlich 0,2% Brij in Schritt A, so fällt die Aufnahme von 3-O-Methylglucose, wie auch die Überlebensrate gegenüber einer ungeschockten Kontrolle um 99% ab.

I.5. Nachweis von Protein in den hyperosmolaren Schocklösungen

In den bisherigen Versuchen wurde gezeigt, daß mit verschiedenen osmotischen Schockverfahren auch aus Zellen von *Neurospora* Proteine gewonnen werden können. Diese Proteine wurden jeweils in der Lösung von Schritt B des osmotischen Schocks (Schockflüssigkeit) nachgewiesen, entsprechend den Befunden, die Neu & Heppel (1965) mit einem Sucroseschock bei *E. coli* erhoben. Auch alle Autoren, die sich des osmotischen Schocks zur Isolierung von Transportproteinen bedienten, gewannen diese aus solcher Schockflüssigkeit. Bereits Nossal & Heppel (1966) entdeckten jedoch auch geringe enzymatische Aktivitäten (u.a. saure Phosphatase) nach Incubation von *E. coli* Zellen in einer Lösung aus 20% Sucrose, 33 mM Tris und 0,1 mM EDTA (Schritt A beim Schockverfahren nach Neu & Heppel, 1965) und Patching & Rose (1971) fanden nach Incubation von Hefezellen in einem gleichen Medium Spuren von Protein. Da bei einigen der hier beschriebenen Schockverfahren in Schritt A Reagenzien verwendet wurden, die, wie weiter oben schon erwähnt, die Lösung von Membranproteinen begünstigen oder vermitteln (EDTA, Mercaptoäthanol, Detergentien, Salzlösungen von hoher Ionenkonzentration), sollten möglicherweise auch in diese Lösungen Proteine aus den Zellen abgegeben werden.

Dies wurde folgendermaßen untersucht. Nach 15 minütiger Incubation gekeimter Konidien in einem der für Schritt A Verwendung findenden Medien wurden die Zellen abfiltriert. Das Filtrat wurde durch ein Sartoriusmembranfilter SM 11302

Tabelle 3

Proteinausbeute aus Schritt A des osmotischen Schocks,
bei Verwendung verschiedener hyperosmolarer Medien

Zusammensetzung des Mediums von Schritt A des osmotischen Schocks				Trockengewicht Gesamtausbeute Protein / 1 g des geschockten an Protein Zeltrockengewicht Myxels (g) (mg) (mg)		
Salz- oder Zuckerlösung	Detergens	MET	EDTA			
Vogels Minimal	0,3% Bri ₁ j ₃₅	-	-	0,477	1,91	4,0
Vogels Minimal	0,3% Bri ₁ j ₅₈	-	-	0,92	7,52	8,17
1,5 M KCl	0,3% Bri ₁ j ₃₅	1 mM	5 mM	1,18	0,96	0,81
0,2 M KCl	0,3% Bri ₁ j ₃₅	1 mM	5 mM	1,09	0,865	0,79
30% Sucrose	0,3% Bri ₁ j ₃₅	-	5 mM	0,411	2,207	5,37
1,5 M Mannit + 0,1 M Tris	-	1 mM	0,5 mM	0,505	3,984	7,89

Tab. 3. Proteinausbeute aus verschiedenen hyperosmolaren Lösungen, die für Schritt A der osmotischen Schockverfahren Verwendung fanden, nach 15 minütiger Inkubation mit 20 h angekeimten und anschließend ausgehungerten Konidien (Titer: $4 \cdot 10^6$ / ml). Nach Entfernen der Zellen zur Trockengewichtsbestimmung, Ultrafiltration der erhaltenen Proteinlösung und Bestimmung ihres Proteingehaltes.

geschickt, um auch etwa darin noch verbliebene Zellen zu entfernen. Danach wurde es zur Verringerung seiner Viskosität im Verhältnis 1 : 3 mit H_2O verdünnt, auf ca $2^{\circ} C$ abgekühlt und mittels Ultrafiltration auf etwa 5 ml eingedickt. Nach viermaligem Waschen mit je 20 ml H_2O wurde anschließend sein Proteingehalt bestimmt. Die dazu erhaltenen Werte sind in Tab. 3. zusammengefaßt. Es zeigt sich, daß mit allen Schockverfahren bei Neurospora bereits in Schritt A Protein in Lösung gebracht werden kann. Die Ausbeute entspricht dabei etwa den Proteinwerten, wie sie auch in der Schockflüssigkeit selbst (Schritt B) gemessen wurden.

Zusammenfassend ergibt sich aus den bisher beschriebenen Untersuchungen, daß der bei Bakterien übliche Schock nach Neu & Heppel (1965) bei *Neurospora* wirkungslos ist. Es wurden daher eine Reihe von neuen Schockverfahren erarbeitet. Mit ihnen war es möglich, aus geschockten Hyphenzellen von *Neurospora crassa* Proteine zu gewinnen.

II Versuche zur Korrelation von Transportdepression und der Abgabe von Transportprotein

Wie im vorigen Abschnitt verschiedentlich angegeben, wird mit den dort beschriebenen Schockverfahren stets ein mehr oder weniger großer Teil der geschockten Zellen abgetötet. Dies erscheint nicht weiter von Nachteil, solange man nur auf die Gewinnung von Protein abzielt. Im vorhergehenden Abschnitt wurde aber durchbegleitende Messungen auch die Fähigkeit geschockter Zellen zur Zuckeraufnahme getestet. Eine Transportdepression nach dem osmotischen Schock wurde als ein erforderliches, wenn auch allein nicht hinreichendes Kriterium für die Abgabe von Transportproteinen gewertet. Der Schluß auf die Abgabe von Transportproteinen ist dann zwingend, wenn ausgeschlossen werden kann, daß der osmotische Schock zusätzlich andere Schäden setzt, die indirekt eine verringerte Zuckeraufnahme bedingen.

Solche Schäden deuten sich aber gerade durch die Abtötung eines Teils der Zellpopulation an. Um Aufschluß über die Art dieser Schäden und ihren etwaigen Einfluß auf den Zuckertransport zu erhalten, wurden Zellen, welche einem Schock mit Vogels Minimal unterworfen worden waren, in verschiedener Weise weiter untersucht. Wie anhand von Abb. 1 erläutert, ist die Zuckeraufnahme derart behandelter Zellen um 63% verringert, die Überlebensrate um 21%. Im folgenden wird erörtert, welche Faktoren, außer dem Verlust von Transportproteinen, zu der Verringerung des Transportes beitragen könnten.

II.1. Abgabe von ^{14}C -Sorbitose aus geschockten und ungeschockten Konidien

Eine Verringerung der Nettoaufnahme wäre dann denkbar, wenn bei den geschockten Konidien die Zuckeraufnahme (Influx) zwar nicht beeinträchtigt, die Abgabe (Efflux) aber wesentlich gesteigert wäre, z.B. durch eine unspezifische Beschädigung der Zellwand oder des Plasmalemmas.

Diese Denkmöglichkeit wurde folgendermaßen geprüft: Konidien, die nach B.7.1. 4 h lang angekeimt waren, wurden auf Membranfilter niedergeschlagen und im 0,075 M Phosphat-Citratpuffer mit 10 μ g Cycloheximid / ml resuspendiert, um eine weitere Keimung der Konidien zu stoppen (Neuhäuser et al., 1970; Pongratz & Klingmüller, 1973). Nach 15 minütiger Einwirkung des Cycloheximids wurde ^{14}C -Sorbitose (0,01 μCi / ml) zugegeben. In einem ersten Parallelansatz wurden die Zellen nach 60 minütiger Incubation in ^{14}C -Sorbitose abfiltriert und geschockt, die Zellen eines zweiten Parallelansatzes aber ungeschockt belassen (osmotischer Schock vgl. C.I.2.1.). Nach Überführen der Konidien in 0,075 M Phosphat-Citratpuffer mit 10 μ g Cycloheximid / ml wurde über einen Zeitraum von 6 h die Abnahme des Sorbitosegehaltes der Zellen dieser beiden Parallelansätze mittels Membranfiltertechnik verfolgt.

Abb. 3 zeigt die Ergebnisse aus einem von zwei dazu durchgeführten Versuchen. Nach 6 h waren bei den beiden Parallelansätzen von der ursprünglich akkumulierten Sorbitose 37% (Wiederholungsversuch: 47%) bei den ungeschockten und 40%

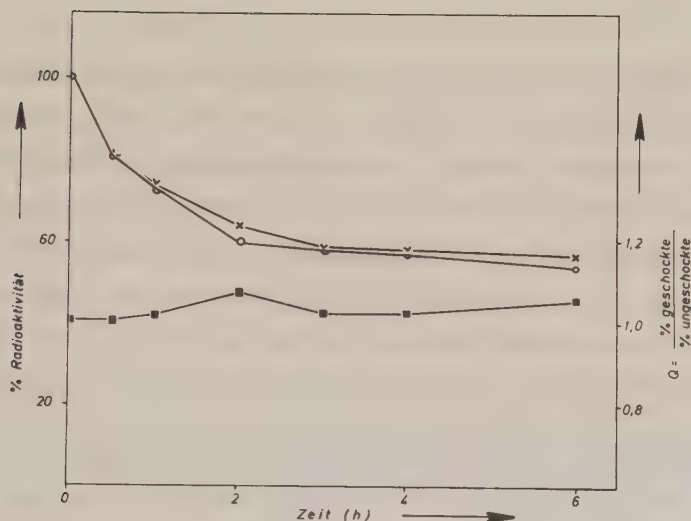


Abb. 2. In geschockten (x), bzw. ungeschockten (o) Konidien verbleibende Radioaktivität.

Mit 0,1% Fructose angekeimte Konidien wurden 1 h lang mit ^{14}C -Sorbose incubiert. Anschließend ein Teil mit Vogels Minimal geschockt, der andere Teil ungeschockt belassen. Danach wurde für einen Zeitraum von 6 h die in den Zellen verbleibende Radioaktivität gemessen. Die sofort nach Überführen der Zellen in dieses Medium gemessene Radioaktivität ($t = 0 \text{ h}$) wurde gleich 100% gesetzt und die übrigen Meß-

daten jedes Ansatzes in Prozent davon ausgedrückt. Zusätzlich wurde für jeden Meßzeitpunkt der Quotient (■) der für die beiden Ansätze erhaltenen Prozentwerte gebildet.

(Wiederholungsversuch: 44%) bei den geschockten Zellen wieder abgegeben worden. Nach einer Stunde - dem Zeitraum, bis zu dem in den früheren Versuchen die Aufnahme gemessen worden war - waren es 21% (Wiederholungsversuch: 28%) bei den ungeschockten und 23% (Wiederholungsversuch: 27%) bei den geschockten Zellen. Die ungeschockten geben prozentual, bezogen auf den Ausgangswert, im Zeitraum bis zu 6 h nahezu gleich viel Sorbose ab wie die geschockten Zellen.

Die Annahme, eine beschleunigte Zuckerabgabe geschockter Zellen führe zu der bei ihnen beobachteten verminderten Nettoaufnahme, trifft demnach nicht zu.

II.2. Atmungsmessungen

Auch andere durch den osmotischen Schock verursachte Schäden könnten eine Verringerung der Zuckeraufnahme bedingen. Um die Größenordnung solcher Schäden zu ermitteln, wurde die Atmung geschockter und ungeschockter Zellen vergleichend gemessen. Da die Zuckeraufnahme ein aktiver, energieabhängiger Vorgang ist, würde eine Atmungsminderung eine Verringerung des Transportes nach sich ziehen.

II.2.1. Atmung gekeimter Konidien

Angekeimte Konidien wurden mit unverdünntem Vogels Minimal geschockt und danach die Atmung gemessen (methodische Angaben in B.12.). Gegenüber einer ungeschockten Kontrolle fällt der Sauerstoffgehalt in der geschockten Suspension im zeitlichen Verlauf um 40 - 50% langsamer (s. Abb. 3). Bei diesen Zahlenwerten wurde - um nur eine Minimalaussage zu treffen - bereits auf eine gleiche Anzahl lebensfähiger Konidien extrapoliert, die durch Plattierung erfaßt worden war. Demnach hat der osmotische Schock einen erheblichen Einfluß auf die Atmungs-tätigkeit der Zellen. Die geringere Atmungsintensität der geschockten Zellen in Verbindung mit der verringerten Überlebensrate dürfte ausreichen, um die nach dem Schock beobachtete Verringerung des Zuckertransportes zu erklären.

II.2.2. Atmung ungekeimter Konidien

II.2.2.1. Atmung osmotisch geschockter Konidien

Wie in I.2.2. erörtert, sind ungekeimte Konidien - was den Sorbosetransport anbelangt - gegenüber einem osmotischen Schock mit Vogels Minimal unempfindlich. Falls die Depression des Transportes durch den Schock bei gekeimten Konidien auf einer Verringerung der Atmung beruht, müßte sich die Unempfindlichkeit des Transportes ungekeimter Konidien gegen einen Schock in einer Unempfindlichkeit ihrer Atmung widerspiegeln. Um das zu prüfen, wurde die Atmung von ungekeimten, 5 h mit Sorbose vorbehandelten und sodann geschockten Konidien mit

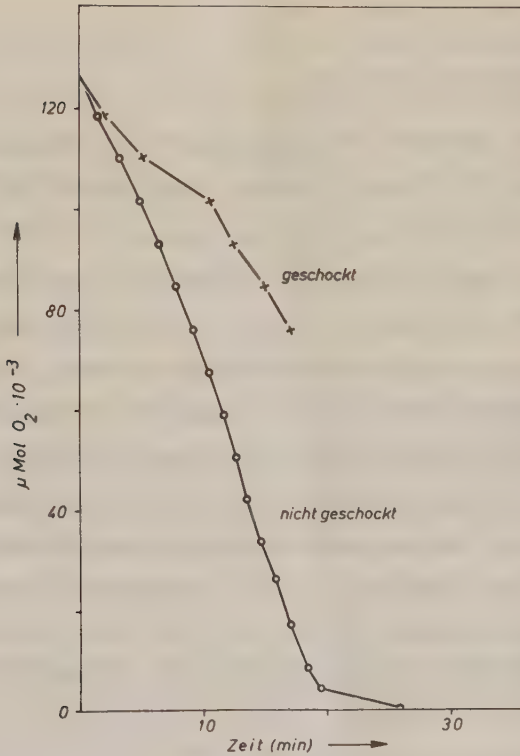


Abb. 3. Atmungsintensität geschockter (x) und ungeschockter (o), angekeimter Konidien, ausgedrückt als Abnahme des Sauerstoffgehaltes der Konidien suspension mit der Zeit.
 $1,6 \cdot 10^8$ Konidien in 40 ml Puffer / Ansatz; 25°C .

derjenigen entsprechend behandelten, aber nicht geschockten Konidien verglichen. Wie Abb. 4 zeigt, führt der osmotische Schock zu keiner Minderung der Atmungstätigkeit, sie ist im Gegenteil geringfügig gesteigert. Tatsächlich sind also Sorbose-transport und Atmung bei ungekeimten Konidien unempfindlich gegen einen osmotischen Schock.

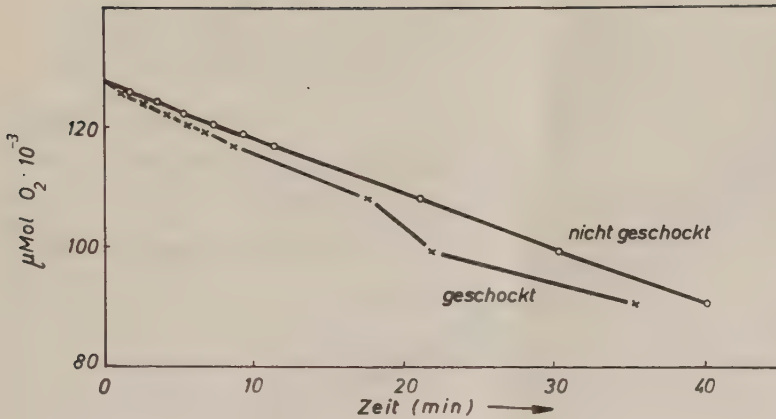


Abb. 4. Atmungsintensität geschockter (x) und ungeschockter (o) Konidien, die nicht angekeimt, aber mit Sorbose vorbehandelt waren. Sonst wie Abb.3.

II.2.2.2. Atmung Triton behandelter Konidien

In Abschnitt I.2.2. wurde angeführt, daß die Incubation von ungekeimten, mit Sorbose vorbehandelten Konidien in Tritonlösungen den Sorbosetransport beeinträchtigt. Es stellte sich die Frage, ob in diesem Fall im Gegensatz zu dem soeben behandelten, eine Verringerung der Atmung sichtbar würde. Die Messungen an Zellen, welche 30 min lang mit 2,5% Triton behandelt worden waren, ergaben jedoch keine Minderung, sondern einen leichten Anstieg der Atmung, verglichen mit gleich*, jedoch nicht mit Triton behandelten Kontrollen (Abb.5).

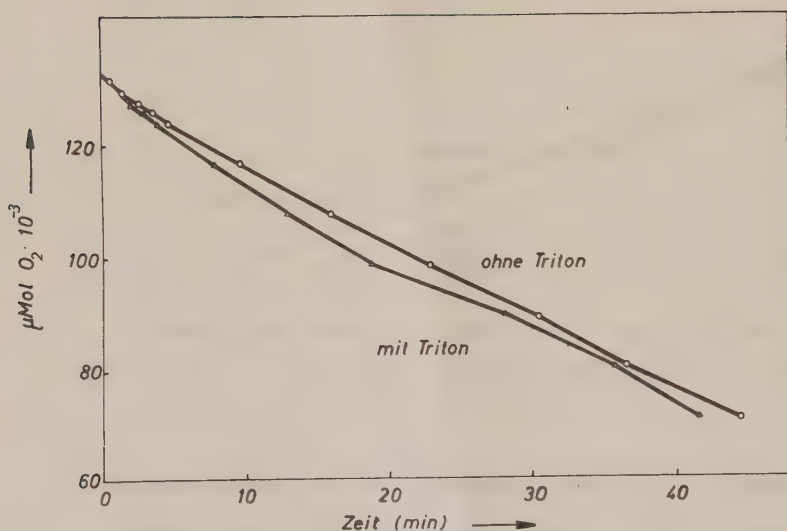


Abb. 5. Atmungsintensität Sorbose vorbehandelter Konidien nach Incubation mit (Δ) oder ohne (o) Triton. Sonst wie Abb. 3.

Der verminderte Sorbosetransport bei Triton-behandelten Zellen konnte nicht vollständig durch die verringerte Überlebensrate dieser Zellen erklärt werden (Hack & Klingmüller, 1971). Da die Atmung der Zellen nicht beeinträchtigt ist, müssen zumindest für einen Teil der hier beobachteten Transportdepression zusätzliche Faktoren verantwortlich sein. Sie unterscheidet sich somit offensichtlich prinzipiell von der nach dem osmotischen Schock erzielten Transportdepression.

Im vorstehenden Abschnitt wurde gezeigt, daß Zellen von *Neurospora crassa* nach dem osmotischen Schock im zeitlichen Verlauf gleichviel Zucker abgeben wie ungeschockte Zellen. Der Efflux von Zuckern ist demnach unbeeinflusst. Geschockte Zellen können aber eine Verringerung ihrer Atmungsintensität aufweisen. Diese kann auch ohne Verlust von Schockproteinen eine Transportdepression bedingen.

III. Auftrennung und Charakterisierung von Schockproteinen

Chromatographische und elektrophoretische Untersuchungen an Schockproteinen von *Salmonella typhimurium* (Lever, 1972) und *Escherichia coli* (Boos, 1969) haben gezeigt, daß sie ein Gemisch verschiedener Proteinspezies darstellen. Bei *E. coli* konnten eine Reihe von Bindeproteinen (Anraku, 1971) und Enzymen (Heppel, 1967), sowie niedrigmolekulare Stoffe (Nishimune & Hayashi, 1971; Leder, 1972) erhalten und z.T. auch genauer charakterisiert werden. Für *Neurospora crassa* liegen nur Angaben von Wiley (1970) vor. Er hat durch Sucroseschock erhaltene Proteine durch Sephadexchromatographie in zwei Fraktionen aufgeteilt, von denen die eine alkalische Phosphatase, die andere ein Tryptophan Bindeprotein enthielt.

Um Aufschluß über die Zusammensetzung der hier gewonnenen Schockproteine zu erhalten, wurden die folgenden Versuche damit durchgeführt.

III.1. Gelchromatographische Auftrennung von Schockproteinen

Protein aus der Schockflüssigkeit des Mannitverfahrens wurde in gleicher Weise wie von Wiley über eine Sephadex G 100 Säule (2,6 · 50 cm) aufgetrennt (B.12.). Das Eluationsprofil, gemessen als optische Dichte bei 280 nm, besteht aus drei Peaks und einer kleineren Schulter (Abb. 7). Damit zeigt sich bereits, daß mit dem hier angewendeten Schockverfahren

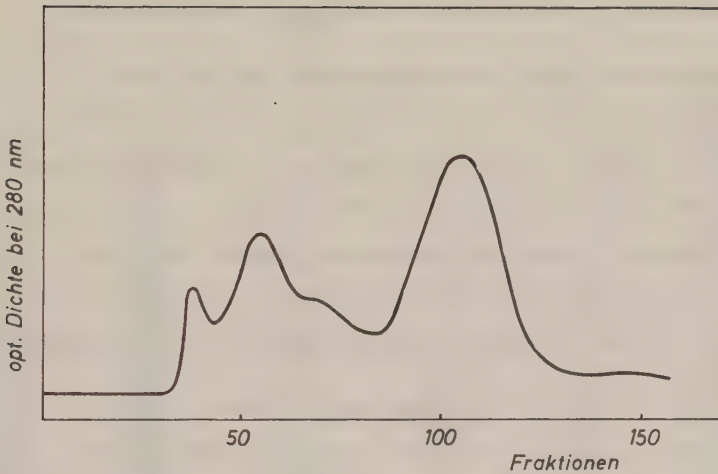


Abb. 6. Gelchromatographische Auftrennung eines Schockproteingemisches. Auf die Sephadex G 100 Säule wurden 30 mg Schockproteine aufgetragen (Auftrag $\hat{=}$ Fraktionsnummer 1) und mit einem 0,2 M Tris / HCl Puffer pH 7,2 eluiert. Die optische Dichte des Eluats wurde im Uvicord bei 280 nm gemessen.

ein vielfältiger zusammengesetztes Schockproteingemisch erhalten wurde als von Wiley (1970).

III.2. Elektrophoretische Auftrennung von Schockproteinen

Die Fraktionierung eines Proteingemisches mittels Gelchromatographie erlaubt noch keine Aussage über die Anzahl der mit einem Schockverfahren isolierbaren Proteine. Gerade diese muß aber als ein Maß für die Brauchbarkeit eines Schockverfahrens gelten. Um sie zu ermitteln, müssen Trennverfahren mit einem größeren Auflösungsvermögen angewendet werden, als es mit der Gelchromatographie erreicht werden kann.

Geeignet dafür erscheint die Diskelektrophorese. Denn bei dieser Methode werden die Proteine nicht nur nach der Molekülgröße - wie bei der Sephadex-Gelchromatographie - gesiebt, sondern deren elektrische Ladung wird zur Auftrennung ausgenutzt. Zusätzlich wird das Auflösungsvermögen der Disk-elektrophorese noch durch ein dem Trenngel vorgeschaltetes Sammelgel erhöht, das die einzelnen Proteinarten in schmalen Banden konzentriert.

III.2.1. Vergleichende Auftrennung von Proteinen aus verschiedenen hypoosmolaren Schocklösungen

Die diskelektrophoretische Auftrennung von Schockproteinen wurde in einem 7,5%igen Polyacrylamidgel durchgeführt (B.13.). Wie Abb. 7 zeigt, trennt sich das Proteingemisch aus dem Mannitverfahren in ca. 25 Banden auf (Abb. 7.b), Proteingemische aus anderen Schockverfahren ergeben weniger Banden (Abb. 7.d,e,f). Diese bilden auch im Vergleich zu dem nach dem Mannitverfahren gewonnenen Proteingemisch unterschiedliche

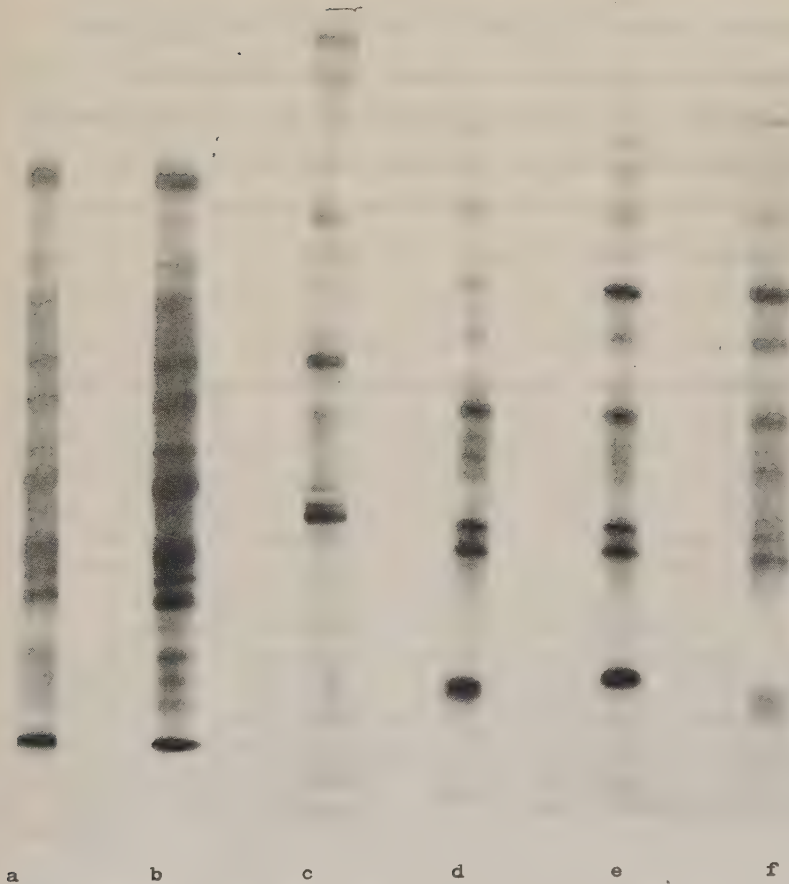


Abb. 7. Diskelektrophoretische Auftrennung von verschiedenen Schockproteingemischen:

- a) Protein aus Schritt A des Mannitverfahrens
- b) Protein aus Schritt B des Mannitverfahrens
- c) Protein aus Schritt A des Schocks mit Vogels Minimal+Brij₃₅
- d) Protein aus Schritt B des Schocks mit Vogels Minimal+Brij₃₅
- e) Protein aus Schritt B des Schocks mit Vogels Minimal+Brij₅₈
- f) Protein aus Schritt B des Schocks mit 30% iger Sucrose-
lösung, 10^{-2} M EDTA + Brij₃₅

Bandenmuster, während alle unter Verwendung eines Detergens gewonnenen Proteingemische eine ähnliche Zusammensetzung erkennen lassen. Das heißt, daß wenigstens zwei verschieden zusammengesetzte Schockproteingemische erhalten werden; zumindest gehen aber beim Mannitverfahren, gegenüber den anderen Verfahren, zusätzliche Proteine in Lösung.

III.2.2. Vergleichende Auftrennung von Proteinen aus verschiedenen hyperosmolaren Schocklösungen

In weiteren Untersuchungen wurde geprüft, ob hyper- bzw. hypoosmolare Lösungen desselben Schockverfahrens gleiche oder verschiedene Proteine enthalten. Aufnahmen der Bandenmuster, die nach der gelelektrophoretischen Auftrennung von zwei verschiedenen hyperosmolar gewonnenen Proteingemischen gefunden wurden, werden in Abb. 7.a und 7.c gezeigt. Die Auftrennung wurde dabei im selben Arbeitsgang wie die Auftrennung der hypoosmolar gewonnenen Proteine (Abb. 7.b und 7.d) durchgeführt. Danach ist die Zusammensetzung der beiden Proteingemische, die nach dem Mannitverfahren gewonnen wurden, weitgehend gleich (Abb. 7.a und 7.b). Die entsprechenden beiden Proteingemische, gewonnen aus dem Schockverfahren mit Vogels Minimal und Brij₃₅ weisen hingegen deutliche Unterschiede auf (Abb. 7.c und 7.d). Diese Unterschiede könnten aber möglicherweise auch davon herrühren, daß in dem betreffenden Proteingemisch noch Spuren des in Schritt A verwendeten Detergens enthalten waren.

III.3. Enzymaktivitäten von Schockproteinen

Heppel (1967) fand in der Schockflüssigkeit von *E. coli* ausschließlich solche Enzyme, die im Bereich der Cytoplasmamembran lokalisiert sind. Er hatte damit eine Methode für die Isolierung von Proteinen dieses Zellkompartiments zur Hand ohne Verunreinigung durch intrazelluläre Proteine. Ob ähnliches auch für Schockproteine von *Neurospora* zutrifft, wurde geprüft. Es sind hier allerdings bisher nur wenige Leitenzyme für die Zellwand oder das Plasmalemma bekannt. Nach Angaben von Wiley (1970) und Metzenberg (1963) scheint alkalische Phosphatase sowohl in der Cytoplasmamembran - wie dies auch für andere Organismen beschrieben ist (Müller & Remke, 1973) - als auch intracellulär vorzukommen; ähnlich ist die Situation bei *Saccharomyces cerevisiae* (Nurminen et al., 1970). Im Bereich zwischen Wand und Plasmamembran ist bei *Neurospora* (Metzenberg, 1963; Bigger et al., 1972), wie bei *Saccharomyces* (Chang & Trevithick, 1972; Arnold, 1972) β -D-fructofuranosidase vorhanden. Weiterhin sind bei *Saccharomyces cerevisiae* saure Phosphatase und eine Oligomycin unempfindliche ATP-ase als Enzyme des Plasmalemmas nachgewiesen und gut charakterisiert (Matile et al., 1967; Nurminen et al., 1970). Letztere wurde auch von Brass (pers. Mitteilung) in isoliertem Plasmalemma von *Neurospora* gefunden.

Tab. 4. faßt die Ergebnisse von entsprechenden Messungen an den mit dem Mannitverfahren gewonnenen Proteingemischen zusammen. Darin sind demnach Enzyme vorhanden, die als Leitenzyme für Zellwand und Plasmalemma in Frage kommen (saure

Tabelle 4

Enzym	spez. Aktivität in Schockproteingemisch	
	aus Schritt A	aus Schritt B
saure Phosphatase (EC 3.1.3.2.)	1,50 $\pm$ 0,17	6,22 $\pm$ 0,13
alkal. Phosphatase (EC 3.1.3.1.)	7,46 $\pm$ 0,42	6,76 $\pm$ 1,03
ATP ase (EC 3.6.1.4.)	17,02 $\pm$ 0,34	3,48 $\pm$ 0,17
β -Fructofuranosidase (EC 3.2.1.26.)	<0,01	<0,01
Succinatdehydrogenase (EC 1.3.99.1.)	<0,01	<0,01

Enzymaktivitäten in Schockproteingemischen, die aus der hyperosmolaren (Schritt A) bzw. hypoosmolaren (Schritt B) Lösung des Mannitverfahrens gewonnen wurden. Angegeben sind die Mittelwerte aus jeweils drei Versuchen.

Phosphatase und ATP-ase). Dies spricht dafür, daß mit dem Schock jene Zonen der Zelle erfaßt werden, in denen auch Transportproteine lokalisiert sein sollten. Für das Fehlen von β -Fructofuranosidase kann vorerst keine gesicherte Erklärung gegeben werden, doch wäre die Annahme einer Katabolitrepression naheliegend. Der Nachweis von alkalischer

Phosphatase ist wegen des gleichzeitigen intracellulären Vorkommens dieses Enzyms von geringem Aussagewert; in Verbindung mit zusätzlichen Versuchen spricht er jedoch ebenfalls für eine Erfassung des Plasmalemmas. In ihnen wurden nämlich die Proteingemische auf etwa vorhandene Aktivität von Succinatdehydrogenase getestet. Dieses Enzym, das in den Mitochondrien lokalisiert ist, sollte nicht vorhanden sein, falls nur Proteine der Zellperipherie durch den osmotischen Schock in Lösung gebracht werden. Tatsächlich konnte in den Schockprotein gemischen keine derartige Aktivität gemessen werden.

III.4. Nachweis von Isoenzymen der alkalischen Phosphatase

Die nachgewiesenen Enzyme machen sicher nur einen Teil des gesamten Schockproteingemisches aus, denn nach den Ergebnissen der diskelektrophoretischen Auftrennung setzt sich dieses aus bis zu 25 verschiedenen Proteinen zusammen; davon sollten einige den bereits nachgewiesenen Enzymen entsprechen. Von diesen Enzymen müßte die alkalische Phosphatase nach elektrophoretischer Auftrennung im Gel auch lokalisiert werden können, wenn ihr 4-Nitrophenylphosphat als Substrat angeboten wird. Dessen enzymatische Spaltung ergibt p-Nitrophenol, ein Reaktionsprodukt von gelber Farbe. Gele in welchen je 200 μ Protein aus Schritt A bzw. B des Mannitverfahrens diskelektrophoretisch aufgetrennt worden waren, wurden aus den Glasröhrchen herausgelöst (als Gleitflüssigkeit wurde H_2O anstelle von Glycerin benützt) und 20 min im Nachweisreagens für alkalische Phosphatase incubiert. Proteine aus Schritt B

des osmotischen Schocks bildeten zwei gelbe Banden, denen die R_f -Werte 0,53 und 0,8 zukommen; mit Protein aus Schritt A hingegen wurden drei derartige Banden nachgewiesen mit den R_f -Werten 0,16; 0,52 und 0,8. Nach Ergebnissen von Versuchen, in denen Proteine aus Schritt A und B gemeinsam in einem Gel aufgetrennt wurden, sind die beiden schneller wandernden Banden von Protein aus Schritt A mit den beiden Banden der Schritt B-Proteine identisch. Schockproteingemische aus Schritt A bzw. Schritt B des Mannitverfahrens sind also nicht völlig gleich, obwohl dies nach Abschnitt II.2.2. zunächst angenommen werden durfte.

Zusammenfassend zu diesem Abschnitt ergibt sich, daß die mit den verschiedenen Schockverfahren erhaltenen Proteingemische aus einer größeren Anzahl von Proteinen bestehen, unter denen Leitenzyme des Plasmalemmas nachgewiesen werden können.

IV. Bindeaktivität von Schockprotein für ^{14}C -Glucose

Wie im vorigen Abschnitt durch Messung geeigneter Leitenzyme nachgewiesen, sind unter den Schockproteinen Membranproteine vorhanden. Den hier ausgearbeiteten Schockverfahren kommt somit prinzipiell eine ähnliche Bedeutung für die Isolierung von Membranproteinen zu, wie dem Schockverfahren von Neu & Heppel bei Bakterien. Von besonderem Interesse sind diese Verfahren nun vor allem im Hinblick auf die Gewinnung von Transportproteinen.

Wie in der Einleitung dargelegt, kann zum Nachweis solcher Proteine i.a. nur deren spezifische Bindefunktion für das zu transportierende Substrat dienen. Dieser Nachweis ist schwierig, weil kein chemischer Unterschied zwischen gebundenem und ungebundenem Substrat besteht. Es müssen also andere Methoden als chemisch analytische benutzt werden, um Bindeaktivität erkennen zu können. Geeignete Nachweisverfahren sind: die Gleichgewichtsdialyse (Anraku, 1967), "Equilibrium Partition" (Gray & Chamberlain, 1971) und verschiedene Filtrationsmethoden (Paulus, 1969; Lever, 1972).

IV.1. Nachweis von Bindeaktivität

Zur Prüfung auf Bindeaktivität der aus Schockflüssigkeit des Mannitverfahrens isolierten Proteine wurde zunächst das methodisch einfachste Verfahren, nämlich die Gleichgewichtsdialyse benutzt. Dabei wird das Protein gegen radioaktiv markiertes Substrat dialysiert. Findet sich nach Ein-

stellung des Gleichgewichts in der Proteinlösung pro Aliquot ein höherer Radioaktivitätsanteil als im Dialysemedium, so deutet dies Bindeaktivität an. Die mit dieser Methode erzielten Resultate, die Bindeaktivität anzuzeigen schienen, konnten jedoch nicht mit ausreichender Signifikanz abgesichert werden. Die Versuche zeigten aber, daß die Messungen nicht im Bereich des in vivo pH-Optimums des Glucose-Sorbose ¹transportsystems (pH 4,75; Klingmüller & Huh, 1972) durchgeführt werden können, da bei sauren pH Werten Proteine aus der Lösung ausflockten. Sie blieben jedoch im neutralen und leichtalkalischen Bereich stabil in Lösung. Weitere Gleichgewichtsdialysen, sowie die im folgenden zu besprechenden anderen Bindetests wurden daher bei pH 7,2 durchgeführt.

Die Ursache dafür, daß mit der Gleichgewichtsdialyse keine signifikanten Ergebnisse erhalten wurden, könnte darin liegen, daß bei dieser Methode das an Protein gebundene radioaktive Substrat nicht von demjenigen abgetrennt werden kann, das ungebunden bleibt. Es muß daher Bindeaktivität gegen eine sehr hohe "background" Aktivität gemessen werden.

Ähnlich ungeeignet erschien in dieser Hinsicht auch die als "Equilibrium Partition" bezeichnete Methode, da hierbei nur insofern ein Unterschied gegenüber der Gleichgewichtsdialyse besteht, als die Trennung Protein - Substrat nicht durch eine Dialysemembran, sondern durch ein zweiphasisches Lösungsmittelsystem erfolgt.

Eine auf gleichem Prinzip beruhende, jedoch wesentlich ver-

besserte Methode hat Paulus (1969) angegeben. Bei ihr wird mittels Ultrafiltration das auf Bindeaktivität zu testende Proteingemisch zusammen mit radioaktivem Substrat auf geeignete Membranfilter (Amicon UM 10) abfiltriert. Auf dem Filter wird nur der Teil der Aktivität zurückgehalten, der an Protein gebunden ist, während die restliche Radioaktivität beinahe vollständig abgetrennt wird. Infolgedessen liegt bei diesem Verfahren die Nachweisgrenze für Bindeaktivität viel tiefer als bei den anderen.

Der Test auf Bindeaktivität nach der Ultrafiltrationsmethode wurde mit Protein aus der Schockflüssigkeit des Mannitverfahrens durchgeführt. 200 μ g Protein, in 0,5 ml Tris / HCl Puffer pH 7,2 wurden mit 0,5 μ Ci 14 C-Glucose versetzt und im Ultrafiltrationsgerät nach Paulus (1969) auf Membranfilter niedergeschlagen (vgl. B.11.2.). Gleiche Ansätze, jedoch ohne Protein dienten als Kontrolle. Findet sich auf den Filtern aus den Ansätzen mit Protein höhere Radioaktivität als auf denen ohne Protein, so deutet das Bindeaktivität an.

Ergebnisse entsprechender Versuche, bei denen 14 C-Glucose als Substrat diente, sind in den beiden ersten Spalten der Tab. 5 zusammengefaßt. Sie belegen, daß aus Neurosporaazellen isolierte Schockproteine Bindeaktivität für Glucose zeigen.

Tabelle 5

Radioaktivität (nci) von Proben versetzt mit ^{14}C -Glucose +

200 μ Protein	ohne Protein (Kontrolle)	200 μ Protein + 100 mM Sorbose	200 μ Protein + 100 mM Fructose	200 μ Protein + 100 mM Galactose
3,576 $\pm$ 0,19	1,68 $\pm$ 0,099			
4,12	1,93			
3,58	2,46			
4,56 $\pm$ 0,05	2,15	2,37 $\pm$ 0,14		
3,87	2,02	2,16		
3,57 $\pm$ 0,058	1,96		3,858 $\pm$ 0,079	
3,26	2,25		3,24	
3,73 $\pm$ 0,037	2,6			3,895 $\pm$ 0,006
3,47	1,96			3,46

Bindeaktivität von Schockproteinen für ^{14}C -Glucose, gemessen in Abwesenheit oder in Gegenwart verschiedener anderer Zucker im Testansatz. Versuchsdurchführung nach der Ultrafiltrationsmethode von Paulus (1969). Direkt vergleichbar sind die Ergebnisse je einer Versuchsserie (gleiche Zeile). Bei Angabe einer Fehlerschwankung wurde der Mittelwert aus den Ergebnissen dreier Parallelproben gebildet, sonst ist der Mittelwert für zwei Parallelproben angegeben.

IV.2. Spezifität der Bindeaktivität

IV.2.1. Kontrollversuche mit denaturierten Schockproteinen

Wie spezifisch die gemessene Bindeaktivität tatsächlich ist, wurde in weiteren Versuchen geprüft. Da über Ultrafilter abfiltrierte Proteine über diesem eine Sekundärmembran bilden (Strathmann, 1970), wäre es denkbar, daß in ihr rein passiv Radioaktivität eingeschlossen und somit Bindeaktivität vorgetäuscht wird. Es wurden daher Kontrollversuche mit hitze-denaturierten Schockproteinen (15 min bei 90°C) angestellt. Wurden solche Proteine anstelle nicht denaturierter zum Bindetest eingesetzt, so zeigte sich in der Tat, daß bei diesen Ansätzen etwas mehr Radioaktivität auf den Filtern verbleibt, als bei den früheren Kontrollansätzen; und zwar war die Radioaktivität von Filtern, die mit denaturiertem Protein beschickt wurden, um $17 \pm 5\%$ gegenüber den früheren Kontrollansätzen mit Filtern ohne Protein gesteigert (Mittelwert aus 4 Versuchen). Dieser passive, sekundäre Effekt läßt sich, wenn auch in geringerem Ausmaß, auch mit Rinder Serum-Albumin erzielen. Eine graphische Darstellung dazu bringt Abb. 8.

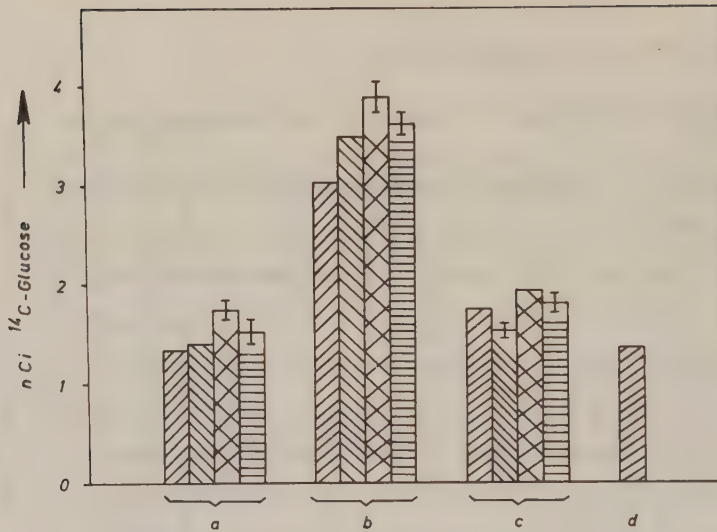


Abb. 8. Bindeaktivität von Schockproteinen für ^{14}C -Glucose sowohl ohne wie auch nach vorausgehender 15 minütiger Hitzebehandlung bei 90°C .

Auf Amicon UM 10 Membranen wurde 0,5 ml einer Lösung abfiltriert bestehend aus: 25 mM Tris / HCl Puffer, pH 7,2;

0,5 μCi ^{14}C -Glucose zusammen mit:

- a) ohne Protein (Kontrolle)
- b) 200 μg Schockprotein
- c) 200 μg Schockprotein, zuvor 15 min auf 90°C erhitzt
- d) 200 μg Serum Albumin

Gemessen wurde die auf den Filtern zurückgehaltene Radioaktivität (bei a, b und c vier Wiederholungsversuche; gleiche Schraffierung: Ergebnisse einer Versuchsserie). Direkt vergleichbar sind die Ergebnisse je einer Versuchsserie. Bei Angabe einer Fehlerschwankung wurde der Mittelwert aus den Ergebnissen dreier Parallelproben gebildet, sonst ist der Mittelwert für zwei Parallelproben angegeben.

IV.2.2. Einfluß von Ionen auf die Bindeaktivität

Spezifische Proteineigenschaften sind oft abhängig vom Ionenmilieu. Für eine Spezifität der Glucose Bindeaktivität spräche deshalb, wenn sich eine derartige Abhängigkeit finden ließe. In weiteren Bindetests wurden daher neben dem Standardpuffer auch Ionen verschiedener Wertigkeit, nämlich Mg^{2+} , bzw. PO_4^{3+} Ionen zugesetzt. Während PO_4^{3+} Ionen keinen Einfluß auf die Bindeaktivität zeigten, hemmten Mg^{2+} Ionen in einer Konzentration von 10^{-2} M im Standardansatz (vgl. B.11.2.) die Bindung von Glucose an Schockprotein zu 61% (Wiederholungsversuch: 55%). Nach Zugabe von $2 \cdot 10^{-2}$ M EDTA zu Ansätzen mit $MgCl_2$ wurden wieder 80% (Wiederholungsversuch: 87%) der Bindeaktivität erhalten, wie sie bei Abwesenheit von $MgCl_2$ gemessen wurde. Die Hemmwirkung der Mg^{2+} Ionen ist also weitgehend reversibel.

IV.2.3. Kompetitive Hemmversuche

Die Glucosebindeaktivität der Schockproteine ist durch Erhitzen zerstörbar, sowie reversibel durch Mg^{2+} Ionen hemmbar. Das deutet bereits darauf hin, daß hier nicht eine unspezifische Bindung vorliegt. Nach Stein (1967) besteht der qualifizierteste Nachweis für Transportproteine darin, zu zeigen, daß sie in ihrem kompetitiven Verhalten mit demjenigen übereinstimmen, das das zugehörige Transportsystem intakter Zellen zeigt. Für das Glucose-Sorbose Transportsystem von Neurospora wurden hierzu Versuche von Schneider & Wiley und von Scarborough (1970 a und b) angestellt. Die Autoren

fanden, daß Sorbose kompetitiv hemmend auf den Glucosetransport wirkt, nicht aber Fructose und Galactose.

Es war also zu prüfen, ob die Glucose-Bindeaktivität gleichermaßen kompetitiv hemmbar ist. Dazu wurden Schockproteine in folgenden Standardansätzen auf Bindeaktivität getestet: ein erster Ansatz enthielt nur Protein, Puffer und ^{14}C -Glucose, hierzu kam in einem zweiten Ansatz zusätzlich noch einer der drei Zucker in einer Konzentration von 100 mM, ein dritter Kontrollansatz enthielt - wie üblich - kein Protein, nur Puffer und ^{14}C -Glucose. Die Auswertung dieser Versuche - deren Ergebnisse in Tab. 5 Zeile 4 bis 9 zusammengefaßt sind - ergab, daß weder Fructose noch Galactose Einfluß auf die Bindeaktivität für ^{14}C -Glucose hatten. Im Ansatz mit 100 mM Sorbose hingegen wurde nur noch eine Restaktivität von $10 \pm 6\%$ gemessen, verglichen mit dem Testansatz, der keine Sorbose enthielt. Diese Restaktivität dürfte zudem, nach den Ergebnissen von Abschnitt IV.2.1. weitgehend unspezifisch sein. Sorbose hemmt also die Bindung von ^{14}C -Glucose an die Schockproteine kompetitiv, das heißt dieser Zucker ist wie die Glucose Substrat des entsprechenden Bindeproteins. Dies stimmt mit der in vivo gemessenen Spezifität des Glucose-Sorbose Transportsystems überein.

IV.3. Versuche zur SH-Gruppenabhängigkeit der Bindeaktivität

Die Spezifität des Bindevorganges, wie sie durch kompetitive Hemmversuche bestimmt wurde, hängt von den spezifischen Erkennungsstellen der Bindeproteine ab. Bei *E. coli* ist für solche aktiven Zentren einer Reihe von Bindeproteinen bekannt, daß ihre Funktion an intakte SH-Gruppen gebunden ist (Rosen, 1973). Um auch in diesem Punkt zu einer weiteren Charakterisierung der Glucose-Bindeaktivität der Schockproteine zu kommen, wurde der Einfluß von SH-Gruppenreagenzien, wie p-Chloromercuribenzoat (PCMB) oder N-Äthylmaleimid (NÄMI) auf die Bindung von Glucose untersucht. Dazu wurde in Standardansätzen die Bindeaktivität für Glucose ermittelt, und zwar sowohl ohne wie auch unter Hinzufügung jeweils eines der beiden SH-Gruppenreagenzien.

Wie aus den in Tab. 6 zusammengefaßten Ergebnissen hervorgeht, haben weder PCMB noch NÄMI Einfluß auf die Bindeaktivität. Das Bindeprotein des Glucose-Sorbose Transportsystems von *Neurospora* gehört also zu derjenigen Reihe von Bindeproteinen, bei denen im aktiven Zentrum keine SH-Gruppe steht (Weiner & Heppel, 1971).

IV.4. Bindeaktivität fraktionierter Schockproteine

In Abschnitt C.III.1. und C.III.2. wurden chromatographische und elektrophoretische Verfahren zur Auftrennung von Schockproteingemischen beschrieben, die eine Vorstellung von deren Zusammensetzung ergaben. Für eine weitergehende

Tabelle 6

Radioaktivität (nCi) von Proben mit ^{14}C -Glucose +

200 μ Protein	ohne Protein (Kontrolle)	200 μ Protein + 10^{-2} M PCMB	200 μ Protein + 10^{-2} M NÄMI
3,76	1,87	3,71	
3,42	1,46	3,24	
3,48 $\pm$ 0,35	1,80 $\pm$ 0,2		3,46 $\pm$ 0,4

Bindeaktivität von Schockproteinen für ^{14}C -Glucose, gemessen in Abwesenheit oder in Gegenwart von SH-Gruppenreagenzien (PCMB: p-Chloromercuribenzoat, NÄMI: N-Äthylmaleimid).

Sonst wie Tab.5.

Charakterisierung ist es naheliegend, daß diese Verfahren mit dem Ziel einer Reindarstellung von Bindeprotein eingesetzt werden. Dazu wurden sowohl Sephadex- wie Polyacrylamidsäulen mit 0,1 mCi ^{14}C -Glucose / cm^3 Säulenmaterial vorbeladen. Nach Auftrennung von Schockproteinen sollten sich diejenigen Fraktionen, denen Bindeaktivität zukommt, durch erhöhte Radioaktivität auszeichnen, Dies traf jedoch für keine der erhaltenen Fraktionen zu. Ähnlich negativ verliefen auch Versuche, bei denen Fraktionen aus der Auftrennung an der Sephadex-Säule durch Ultrafiltration wieder eingedickt und danach auf Bindeaktivität getestet wurden. Selbst

nach Zusatz von 20% Glycerin zum Eluationspuffer zur Vermeidung einer etwaigen Denaturierung fand sich in keinem der drei nach Abb. 6 erhaltenen Peaks Bindeaktivität. Der Grund könnte sein, daß trotz Zusatz von Glycerin eine Denaturierung der Glucose- bindenden Komponente erfolgte.

Eine andere Denkmöglichkeit wäre aber, daß die Bindeaktivität z.B. das Zusammenarbeiten zweier Proteine erfordert, die in der Säule voneinander getrennt wurden. Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurden nach Auftrennung der Schockproteine über die Sephadexsäule sämtliche Fraktionen wieder vereinigt. Dieses Gemisch, das alle Komponenten der Schockflüssigkeit wieder enthalten sollte, wurde nun auf Bindeaktivität getestet. Abb. 9 zeigt die Ergebnisse aus solchen Versuchen. Die Befunde sprechen dafür, daß in einem nach Auftrennung wiedervereinigten Proteingemisch erneut Bindeaktivität auftritt. Die Glucose-Bindeaktivität von Schockproteinen wird also durch die Auftrennung über eine Sephadex-Säule nicht irreversibel zerstört, sondern verschwindet in reversibler Weise.

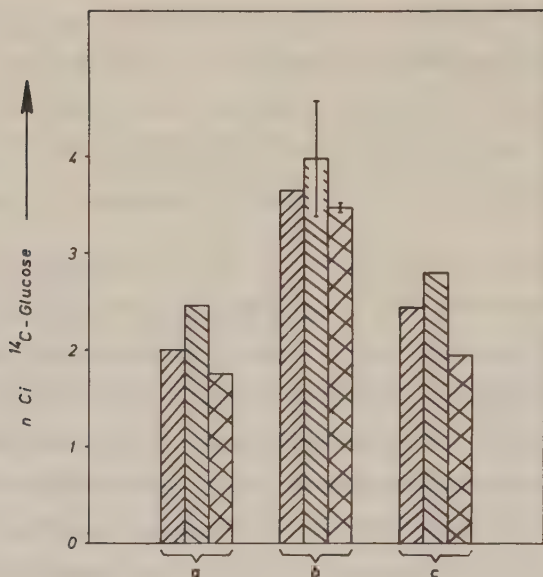


Abb. 9. Bindeaktivität von reassoziertem Schockprotein für ^{14}C -Glucose.

Die Schockproteine dieser Versuchsserie setzten sich aus einem Gemisch aller Fraktionen zusammen, die nach Auftrennung von Schockproteinen über eine Sephadex G 100 Säule erhalten wurden. Sonst wie Abb. 8.

Zusammenfassend zu diesem Abschnitt ergibt sich, daß die hier untersuchten Schockproteine Bindeaktivität für ^{14}C -Glucose haben. Die Bindeaktivität ist hitzelabil, durch Mg^{2+} Ionen reversibel und durch Sorbose kompetitiv hemmbar. Sie verschwindet bei Auftrennung der Proteine über Sephadex und Polyacrylamid, erscheint jedoch erneut, wenn alle erhaltenen Fraktionen wiedervereinigt werden.

D. DISKUSSION

Für die Isolierung von Transportproteinen stellt sich einerseits das Problem, diese aus den Zellmembranen in Lösung zu bringen und andererseits, sie unter einer Vielzahl gelöster Proteine durch geeignete Nachweismethoden sicher anzusprechen. Seit Erarbeitung des osmotischen Schocks durch Neu & Heppel (1965) stand zumindest für Bakterien ein Verfahren zur Gewinnung von Transportproteinen zur Verfügung, das - wie einleitend dargelegt - gegenüber anderen diesbezüglichen Methoden erhebliche Vorteile aufweist.

In der vorstehenden Arbeit wurden erstmals Versuche unternommen, Komponenten des Glucose-Sorbose Transportsystems von *Neurospora crassa* ebenfalls mittels osmotischem Schock zu isolieren.

Als notwendiges, wenn auch allein nicht hinreichendes Kriterium für ein taugliches Schockverfahren wurde die Verringerung der Sorbose- bzw. Glucoseaufnahme geschockter Zellen gewählt; durch entsprechende Transportmessungen wurden potentiell für die Isolierung der gesuchten Transportproteine geeignete Schockverfahren von ungeeigneten unterschieden.

Unter Zugrundelegen dieses Kriteriums war eine Schockbehandlung von gekeimten Konidien mit Sucroslösungen - entsprechend dem bei Bakterien üblichen Schockverfahren von Neu & Heppel (1965) - negativ; selbst die Verwendung höher osmolarer Sucroslösungen führte nicht zu positiven Resultaten. Im Gegensatz zu den Erwartungen bewirkte der Sucroresschock viel-

mehr bei gekeimten Konidien von *Neurospora* eine Steigerung der Sorboseaufnahme. Diese Steigerung der Sorboseaufnahme durch Sucrose läßt sich interpretieren, wenn man berücksichtigt, daß das hier untersuchte Glucose-Sorbose Transportsystem ein aktives, also energieabhängiges System ist. Das Eindringen von Sucrose in die Konidien während des osmotischen Schocks bedeutet für diese die Bereitstellung eines Substrates zur Gewinnung von Stoffwechselenergie, was zur Steigerung der Sorboseaufnahme führen sollte.

Da auch andere Autoren das Schockverfahren von Neu & Heppel sowohl bei Bakterien (Anraku, 1971; Weiner & Heppel, 1971), wie auch bei Hefe (Schwencke et al., 1971) gegenüber bestimmten Transportsystemen wenig wirksam oder gar wirkungslos fanden, scheint dessen Anwendungsbereich sehr begrenzt.

Bei der Suche nach einem besser geeigneten Schockverfahren wurde berücksichtigt, durch welche Kräfte Proteine an der Membran festgehalten werden, die es zur Lösung dieser Proteine zu überwinden gilt. Diese können sowohl durch hydrophobe und hydrophile Bindungen an Lipide gebunden sein, wie auch durch alle zwischen Proteinen möglichen Bindungen an benachbarte Membranproteine vernetzt sein (Vanderkooi & Green, 1971). Es wurden nun eine Reihe von Schockverfahren erarbeitet, die Bedingungen ausnützen, die zur Lösung dieser Bindungen geeignet sind (vgl. Ergebnisse I). Dabei war festzustellen, daß durch eine Kombination solcher Bedingungen sich eine stärkere als eine rein additive Wirkung erzielen läßt. So blieb bei ungekeimten Konidien ein alleiniger Schock mit Vogels Minimal wirkungslos. Nach Zusatz von 2% Triton zu

Vogels Minimal jedoch wurde eine starke Depression des Sorbosetransportes erzielt. 2% iges Triton allein wiederum wirktewährend einer Behandlungszeit von 10 min bestenfalls geringfügig. In gleicher Weise war bei gekeimten Konidien die Proteinausbeute nach einem Schock mit Vogels Minimal und BriJ gegenüber einem alleinigen Schock mit der Salzlösung um etwa zwei Zehnerpotenzen erhöht.

Entsprechend den aufgeführten Gesichtspunkten konnten insgesamt eine Reihe verschiedener Schockverfahren erarbeitet werden, von denen einige nicht nur bei gekeimten, sondern auch bei ungekeimten Konidien wirkten. Daß diese gegen einen osmotischen Schock weniger empfindlich sind als Konidien, die sich in Keimung befinden, könnte an der im Vergleich zu Hyphen wesentlich stabileren Wand der Konidien liegen. Der Befund steht im übrigen im Einklang mit Ergebnissen von Neu & Heppel (1965), die an Bakterien erhalten wurden. Hierbei erwiesen sich Zellen, die sich in Ruhephase befinden, als schlechter schockbar als Zellen der logarithmischen Wachstumsphase.

Als Folge des osmotischen Schocks wurde auch stets ein Teil der behandelten Zellen abgetötet. Dies konnte durch Abwandlung der Versuchsbedingungen nicht umgangen werden, im Gegensatz zu den Versuchen an Bakterien (Anraku, 1967). Allerdings sind die Osmolaritäten der verwendeten Schocklösungen wesentlich höher als die der bei Bakterien verwendeten Sucroslösung.

Es scheinen aber nicht nur solche Schädigungen geschockter

Zellen aufzutreten, die zu ihrer Abtötung führen, sondern auch schwächere oder reversible Schädigungen. Darauf deutet die gemessene Verringerung der Atmungsintensität geschockter Zellen hin. Derartige Messungen bei Bakterien scheinen von anderen Autoren nicht vorgenommen worden zu sein, obwohl sich eine solche Depression der Atmung auch bei geschockten Bakterien auf Grund anderer Befunde unterstellen läßt (verringertes Einbau von Leucin, Uracil und Thymin nach osmotischem Schock; Anraku & Heppel, 1967). Solange aber solche Messungen an Bakterien nicht vorliegen, kann aus der dort für geschockte Zellen gefundenen Transportdepression noch nicht auf die Abgabe von Transportproteinen geschlossen werden (Anraku, 1971). Solche Transportmessungen können nur - wie in der vorliegenden Arbeit - zur Unterscheidung zwischen potentiell für die Isolierung von Transportproteinen geeigneten und ungeeigneten Schockverfahren dienen.

Der Hauptanwendungsbereich osmotischer Schockverfahren lag bisher bei Bakterien; das Ziel der meisten dieser Untersuchungen war die Isolierung von Transportproteinen, die i. a. als sogenannte Bindeproteine nachgewiesen wurden. Solche Bindeproteine wurden inzwischen neben Bakterien auch aus einer Reihe von anderen Organismen isoliert und ihre Funktion im Rahmen des zellulären Stofftransportes nachgewiesen oder wahrscheinlich gemacht. Derartige Bindeproteine fanden sich außer bei Bakterien bei Hefe (Hovák & Kotyk, 1973), in Hühnermucosa (Wassermann et al., 1968), in der Hundeniere (Sands & Kessler, 1971) und im Schweinehirn (Wolff & Siegel, 1972).

Die im Schockprotein von *Neurospora* gefundenen Leitenzyme deuten daraufhin, daß auch hier mit dem Vorliegen von Bindeprotein gerechnet werden kann. Zu deren Nachweis wurde in vorliegender Arbeit die Ultrafiltrationmethode nach Paulus (1969) angewendet. Wie im Ergebnisteil dargelegt, zeichnet sich diese Methode v.a. durch ihre günstig liegende niedrige Nachweisgrenze aus. Als Nachteil ist dabei in Kauf zu nehmen, daß bestimmte quantitative Messungen (z.B. die Bestimmung von Dissociationskonstanten) nur unzureichend durchgeführt werden können (Boos et al., 1972; Heyde, 1973). Jedoch können mit dieser Methode gut Versuche zur Unterscheidung von unspezifischen und spezifischen Bindeaktivitäten, sowie - zumindest qualitativ - kompetitive Hemmversuche durchgeführt werden. Auf diese Weise konnte in der vorliegenden Arbeit der Nachweis geführt werden, daß die Spezifität der Bindung in vitro mit der Substratspezifität des Glucose-Sorbose Transportsystems in vivo übereinstimmt, nach Stein (1967) der wichtigste Beleg für das Vorliegen eines entsprechenden Transportproteins.

Zur besseren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erwies es sich dabei als vorteilhaft, eine Versuchsserie mit Ultrafiltern der gleichen Charge durchzuführen.

Als radioaktiv markierter Zucker wurde bei Bindetests stets ^{14}C -Glucose verwendet, da diese in vivo eine höhere Affinität zum Transportsystem zeigte als Sorbose (Scarborough, 1970).

Daß die hier gefundene Bindeaktivität schwach war, könnte folgenden Grund haben: Nach gängigen Modellvorstellungen

kommt Transportproteinen sowohl ein Zustand hoher wie niedriger Affinität zu ihrem Substrat zu (Koch, 1964; Parnes & Boos, 1973; Kotyk, 1973). Es wäre möglich, daß das Glucose-Sorbose Bindeprotein in der isolierten Form die Konformation annimmt, die die niedrige Substrataffinität besitzt. Hier könnte u.a. auch der Grund dafür zu suchen sein, daß bei *E. coli* bestimmte Bindeproteine (Anraku, 1971) nicht isoliert werden konnten.

In dieser Hinsicht scheint das Glucose-Sorbose Bindeprotein von *Neurospora* weitgehend dem Glucose-Bindeprotein von *Saccharomyces cerevisiae* zu gleichen, das von Horák & Kotyk (1973) isoliert wurde. Dieses besitzt eine niedrige Substrataffinität mit einem K_D -Wert, der zwischen 1,5 und 6 mM liegt. Darüberhinaus bestehen weitere Ähnlichkeiten: das Glucose-Bindeprotein von *Saccharomyces* bindet ebenfalls Sorbose, nicht aber Galactose, es ist hitzelabil und seine Aktivität ist nicht SH-Gruppenabhängig. Außerdem zeigt es Unstabilität gegenüber bestimmten Reinigungsverfahren, wie sie auch beim Glucose-Sorbose Bindeprotein von *Neurospora* festzustellen war. Nach den vorliegenden Ergebnissen ließ sich weder in den einzelnen Fraktionen der diskoelektrophoretischen, noch der gelchromatographischen Auftrennung von Schockproteinen Bindeaktivität nachweisen. Eine Denaturierung, oder eine Zerstörung durch Proteasen, wie bei der Tryptophansynthetase von *Neurospora* (Yu et al., 1973) konnte ausgeschlossen werden. Wiedervereinigte Fraktionen der Sephadexauftrennung zeigten nämlich wieder Bindeaktivität. Als naheliegenste Erklärung bietet

sich die Annahme an, daß das Bindeprotein durch die Trennverfahren in Untereinheiten zerfällt. Es sind Beispiele dafür bekannt, daß Transportproteine aus Peptiduntereinheiten (Schrecker & Hengstenberg, 1971) aus einem Protein und einem Lipidanteil (Horák & Kotyk, 1973) oder aus Co- und Apoenzym (Wassermann et al., 1968; Wolff & Siegel, 1972) aufgebaut sind. Im vorliegenden Fall ist die Annahme von Proteinuntereinheiten am wahrscheinlichsten, da durch die wiederholte Ultrafiltration der Schockproteinlösungen Partikel mit einem Molekulargewicht unter 10 000 Dalton abgetrennt wurden. Solche Proteinuntereinheiten kämen als potentielle Kandidaten für die von Klingmüller et al. (1970) aufgrund genetischer Untersuchungen geforderten drei Genprodukte in Frage, die Komponenten des Glucose-Sorbose Transportsystems sein sollten. Die im vorliegenden erarbeiteten Methoden und Ergebnisse dürften bei der weiteren Klärung dieser Frage von Bedeutung sein.

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Ein osmotischer Schock aus konzentrierten Sucroslösungen, vergleichbar dem Verfahren, das von Neu & Heppel (1965) bei Bakterien erarbeitet wurde, ist bei *Neurospora* nicht wirksam.

2. Hyphen von *Neurospora* können mit dem Ergebnis der Abgabe von Protein osmotisch geschockt werden:

- a) aus einer konzentrierten Salzlösung (Vogels Minimal)
- b) aus konzentrierten Salz- oder Zuckerlösungen in Gegenwart von Detergentien oder von EDTA und Mercaptoäthanol.

3. Als Maß für die Effektivität der Schockverfahren wurde die Menge der aus den Zellen abgegebenen Schockproteine bestimmt, sowie die Verringerung der Zuckeraufnahme geschockter Zellen gemessen.

4. Die Abgabe von Protein aus osmotisch geschockten Zellen erfolgt in Lösungen von Schritt A, wie von Schritt B des Schockverfahrens.

5. Neben der Abgabe von Protein, der Depression des Zuckertransportes und der Verringerung der Überlebensrate löst der osmotische Schock auch noch weitere Effekte bei den geschockten Zellen aus. Diese drücken sich in einer verringerten Atmungsintensität geschockter Zellen aus. Aus der Depression des Transportes allein kann somit nicht zwingend auf die Abgabe von Transportproteinen geschlossen werden.

6. Zellen, die wie ungekeimte Konidien keinen Einfluß des osmotischen Schocks auf die Aufnahme von Zuckern erkennen

lassen, sind auch in Bezug auf ihre Atmung resistent gegen osmotischen Schock.

7. Eine Behandlung von gekeimten Konidien mit Detergens (Triton), die ebenfalls zur Depression des Zuckertransportes führt, bewirkt im Gegensatz zum osmotischen Schock keine verringerte Atmungsintensität.

8. Der Efflux von Zuckern wird durch einen osmotischen Schock nicht beeinflusst.

9. Schockproteingemische wurden mittels Gelchromatographie und Diskelektrophorese aufgetrennt. Dabei konnten bis zu 25 verschiedene Proteinfaktionen unterschieden werden.

10. Neben alkalischer Phosphatase (EC 3.1.3.1.) wurden unter den Schockproteinen noch Oligo mycin unsensible ATP ase (EC 3.6.1.4.) und saure Phosphatase (EC 3.1.3.2.) gemessen. Diese Enzyme gelten als Leitenzyme des Plasmalemmas.

11. Schockproteine von Neurospora zeigen Bindeaktivität für ^{14}C -Glucose.

12. Die Bindeaktivität von Schockproteinen ist durch Erhitzen zerstörbar und durch Mg^{++} Ionen reversibel hemmbar; sie ist nicht abhängig von intakten SH-Gruppen.

13. Die Bindeaktivität von Schockproteinen ist - wie in vivo der Glucosetransport - durch Sorbose kompetitiv hemmbar, nicht aber durch Galaktose und Fructose.

16. Einzelne Fraktionen der Schockproteingemische, wie sie durch chromatographische und diskelektrophoretische Trennverfahren erhalten werden, zeigen keine Bindeaktivität. Der Grund kann nicht eine Denaturierung des Bindeproteins sein, da ein Gemisch aller Fraktionen wiederum Bindeaktivität zeigt.

LITERATURVERZEICHNIS

Anraku, Y. (1967)

The reduction and restoration of Galactose transport in osmotically shocked cells of *Escherichia coli*

J. Biol. Chem. 242, 793 - 800

Anraku, Y. & Heppel, L.A. (1967)

On the nature of the changes induced in *Escherichia coli* by osmotic shock

J. Biol Chem. 242, 2561-2569

Anraku, Y. (1971)

Studies on amino acid binding proteins of *Escherichia coli*

J. Biochem. (Tokyo) 69, 243-245

Arnold, W. N. (1972)

The structure of the Yeast cell wall

J. Biol. Chem. 247, 1161-1169

Arrigoni, O. & Singer, Th. P. (1962)

Limitations of the phenazine methosulphate assay for succinic and related dehydrogenases

Nature 193, 1256-1258

Beadle, G. W. & Tatum, E. L. (1941)

Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*

Proc. Nat. Acad. Sci. 27, 499-506

Bergmeyer, H. U. (1970) in

Methoden der enzymatischen Analyse

Verlag Chemie GmbH Weinheim/Bergstraße

Bigger, C. H., White, M. R. & Braymer, H. D. (1972)
Ultrastructure and invertase secretion of the slime mutant
of *Neurospora crassa*
J. Gen. Microbiol. 71, 159-166

Boehringer Mannheim GmbH (1972)
Enzymatische Analysen für die Lebensmittelchemie
Boehringer Mannheim GmbH

Boos, W. (1969)
The galactose binding protein and its relationship to the
 β -methylgalactosid permease from *Escherichia coli*
Europ. J. Biochem. 10, 66-73

Boos, W. & Gordon, A. S. (1971)
Transport properties of the galactose binding protein of
Escherichia coli. Occurrence of two conformational states
J. Biol.Chem. 246, 621-628

Boos, W., Gordon, A. S., Hall, R. & Price, D. (1972)
Transport properties of the galactose binding protein of
Escherichia coli
J. Biol.Chem. 247, 917-924

Brockmann, H. E. & De Serres, F. J. (1963)
Sorbitol toxicity in *Neurospora*
Amer. J. Bot. 50, 709- 714

Chang, P. L. Y. & Trevithick, J. R. (1972)
Release of wall-bound invertase and trehalase in *Neurospora*
crassa by hydrolytic enzymes
J. Gen. Microbiol. 70, 13-22

De Serres, F. J., Kolmark, H. G. & Brockmann H. E. (1962)
Factors influencing the survival of *Neurospora crassa*
conidia in sorbitol - sucrose media
Nature 193, 556-557

Emmelot, P., Bos, C. J., Benedetti, E. L. & Rümke, Ph. (1964)
Studies on plasma membranes. Chemical composition and
enzyme content of plasma membranes isolated from rat liver
Biochim. Biophys. Acta 90. 126-145

Fiske, C. H. & Subbarow, Y. (1925)
The colorimetric determination of phosphorous
J. Biol. Chem. 66, 375-400

Gray, C. W. & Chamberlain, M. J. (1971)
Measurement of ligand - protein binding interactions in a
biphasic aqueous polymer system
Anal. Biochem. 41, 83-104

Hack, A. & Klingmüller, W. (1971)
Wirkung von osmotischem Schock und Triton-Behandlung auf
den Sorbose-Transport von Neurosporazellen
Z. Naturforsch. 26 b, 250-255

Heppel, L. A. (1967)
Selective release of enzymes from bacteria
Science 156, 1451-1455

Heyde, E. (1973)
Difficulties encountered with an ultrafiltration method for
measuring the binding of ligands to protein
Anal. Biochem. 51, 61-66

Horák, J. & Kotyk, A. (1973)
Isolation of a glucose-binding lipoprotein from Yeast
plasma membrane
Europ. J. Biochem. 32, 36-41

Klingmüller, W. (1967 a)
Aktive Aufnahme von Zuckern durch Zellen von Neurospora crassa
unter Beteiligung eines enzymatischen Systems mit Permease-
eigenschaften I
Z. Naturforsch. 22 b, 181-188

- Klingmüller, W. (1967 b)
Kreuzungs-Analyse Sorbose-resistenter Mutanten von
Neurospora crassa
Molec. Gen. Genetics 100, 109-116
- Klingmüller, W. (1967 c)
Analyse der Sorbose-Resistenz von *Neurospora crassa* an
Heterokaryen sorboseresistenter Mutanten; ein Beitrag zur
Genetik des aktiven Transports, I
Molec. Gen. Genetics, 100, 117-139
- Klingmüller, W. (1967 d)
Analyse der Sorbose-Resistenz von *Neurospora crassa* an
Doppelmutanten; ein Beitrag zur Genetik des aktiven Trans-
ports, II
Molec. Gen. Genetics 100, 256-263
- Klingmüller, W., Huh, H. & Kaudewitz, F. (1970)
Regulierende Wirkung des Gen C der Sorbose-Resistenz von
Neurospora crassa auf den Zuckertransport
Molec. Gen. Genetics 109, 27-41
- Klingmüller, W. & Huh, H. (1972)
Sugar transport in *Neurospora crassa*
Europ. J. Biochem. 25, 141-146
- Koch, A. L. (1964)
The role of permease in transport
Biochim. Biophys. Acta. 90, 177-200
- Kotyk, A. (1973)
Mechanisms of nonelektrolyte transport
Biochim. Biophys. Acta 300, 183-210
- Lever, J. E. (1972 a)
Purification and properties of a component of histidine
transport in *Salmonella typhimurium*
J. Biol. Chem. 247, 4317-4326

Lever, J. E. (1972 b)

Quantitative assay of the binding of small molecules to
protein: composition of dialysis and membrane filter assay
Anal. Biochem. 50, 73-83

Lowendorf, H. S. (1972)

Phosphat transport in *Neurospora*

Ph. D. Thesis, Case Western Reserve Univ. 127 p.

Diss. Abstr. Int. 32, 6840-6841

Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J. Farr, A. L. & Randall, R. J.
(1951)

Protein measurement with the folin phenol reagent
J. Biol. Chem. 193, 265-275

Marzluff, G. A. (1970)

Genetic and biochemical studies of distinct sulfate permease
species in different developmental stages of *Neurospora crassa*
Arch. Biochem. Biophys. 138, 254-263

Matile, Ph., Moor, H. & Mühlethaler, K. (1967)

Isolation and properties of the plasmalemma in Yeast
Arch. Mikrobiol. 58, 201-211

Matile, Ph. (1970)

Properties of the purified cytoplasmic membrane of Yeast
FEBS Symposium 20, 39

Maurer, H. R. (1968)

Disk-Elektrophorese. Theorie und Praxis der diskontinuier-
lichen Polyacrylamid-Elektrophorese
Walter de Gruyter & Co, Berlin

Metzenberg, R. L. (1963)

The Lokalisation of β -Fructofuranosidase in *Neurospora*
Biochim. Biophys. Acta 77, 455-465

Neu, H. C. & Heppel, L. A. (1965)

The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts

J. Biol. Chem. 240, 3685-3692

Neuhäuser, A., Klingmüller, W. & Kaudewitz, F. (1970)

Selection Actidion-resistenter Mutanten bei *Neurospora* sowie ihre genetische und biochemische Analyse

Molec. Gen. Genetics 106, 180-194

Nishimune, T. & Hayashi, R. (1971)

Thiamine-binding protein and thiamine uptake by *Escherichia coli*

Biochim. Biophys. Acta 244, 573-583

Nossal, N. G. & Heppel, L. A. (1966)

The release of enzymes by osmotic shock from *Escherichia coli* in exponential phase

J. Biol. Chem. 241, 3055-3062

Nurminen, T. Oura, E. & Suomaleinen, H. (1970)

The enzymic composition of the isolated cellwall and plasma membrane of bakers yeast

Biochem. J. 116, 61-69

Pall, M. L. (1970)

Amido acid transport in *Neurospora crassa* II Properties of a basic amino acid transport system

Biochem. Biophys. Acta 203, 139-149

Parnes, J. R. & Boos, W. (1973)

Unidirectional transport activity mediated by the galactose binding protein of *Escherichia coli*

J. Biol. Chem. 248, 4436-4445

- Patching, J. W. & Rose, A. H. (1971)
Cold osmotic shock in *Saccaromyces cerevisiae*
J. Bacteriol, 108, 451-458
- Paulus, H. (1969)
A rapid and sensitive method for measuring the binding
of radioactive ligands to proteins
Anal. Biochem. 32, 91-100
- Pongratz, M. & Klingmüller, W. (1973)
Role of ribosomes in cycloheximide resistance of *Neurospora*
mutants
Molec. Gen. Genetics 124, 359-363
- Razin, S. (1972)
Reconstitution of biological membranes
Biochim. Biophys. Acta 265, 241-296
- Reynolds, J. A. & Trayer, H. (1971)
Solubility of membrane proteins in aqueous media
J. Bio. Chem. 246, 7337-7342
- Rosen, B. P. (1973)
Basic amino acid transport in *Escherichia coli*
J. Biol. Chem. 248, 1211-1218
- Sands, H. & Kessler, R. H. (1971)
A Calcium binding component of dog kidney cortex and its
relationship to calcium transport
Proc. Soc. exp. Bio. (N.Y.) 137, 1267-1271
- Scarborough, G. A. (1970 a)
Sugar transport in *Neurospora crassa*
J. Biol. Chem. 245, 3985-3987

Scarborough, G. A. (1970 b)

Sugar transport in *Neurospora crassa*

J. Biol.Chem. 245, 1694-1698

Schaumburg, B. P. (1972)

Investigation on the glucocorticoid-binding protein from
rat thymocytes

Biochim. Biophys. Acta 261, 219- 235

Schneider, R. P. & Wiley, W. R. (1971)

Kinetic characteristics of the two glucose transport systems
in *Neurospora crassa*

J. Bacteriol. 106, 479-486

Schrecker, O. & Hengstenberg, W. (1971)

Purification of the lactose specific factor III of the
staphylococcal PEP dependent phosphotransferase system

FEBS Letters 13, 209-212

Schwecke, J., Farias, G. & Rojas, M. (1971)

The release of extracellular enzymes from Yeast by "osmotic
shock"

Europ. J. Biochem. 21, 137-143

Slayman, C. W. (1970)

Net potassium transport in *Neurospora*: properties of a
transport mutant

Biochim. Biophys. Acta 211, 502-512

Slayman, C. W. & Slayman, C. L. (1970)

Potassium transport in *Neurospora*. Evidence for a multisite
carrier at high pH

J. Gen. Physiol. 55, 758-786

Stein, W. D. (1967)

The movement of molecules across cell membranes

Academic Press, New York and London

Strathmann, H. (1970)

Stofftrennung durch Druckfiltration mit semipermeablen
Membranen

Chemie-Ing. Techn. 42. Jahrg. Heft 12, 1095-1102

Sweeny, H., Magill, C. & Woodward, V.W. (1970)

Genetic and kinetic studies of histidine transport mutants
of *Neurospora crassa*

Genetics 64, 63

Teifel, J. (1971)

Untersuchungen zur Kennzeichnung des Sorbose-stimulierbaren
Sorbose Transportsystems von *Neurospora crassa*

Zulassungsarbeit, unveröff., Institut f. Genetik der Uni-
versität München

Vanderkooi, G. & Green D. E. (1971)

New insights into biological membrane structure

Bio Science 21, 409-415

Vogel, H. J. (1956)

A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N.)

Microbial. Genet. Bull. 13, 42-43

Wassermann, R. H., Corradino, R. A. & Taylor, A. N. (1968)

Vitamin D-dependent calcium-binding protein. Purification
and some properties

J. Biol. Chem. 243, 3978-3986

Weiner, J. H. & Heppel, L. A. (1971)

A binding protein for glutamin and its relation to active
transport in *Escherichia coli*

J. Biol. Chem. 246, 6933-6941

Wiley, W. R. (1970)

Tryptophan transport in *Neurospora crassa*: a tryptophan
binding protein released by cold osmotic shock

J. Bacteriol. 103, 656-662

Wolff, D. J. & Siegel, F. L. (1972)

Purifikation of a calcium-binding protein from pig-brain
Arch. Biochem. Biophys. 150, 578-584

Wolfinbarger, L., Jervis, H. H. & De Busk, A. G. (1971)

Active transport of L-aspartic acid in *Neurospora crassa*
Biochim. Biophys. Acta 249, 63-68

Am Ende dieser Arbeit habe ich zu danken Herrn Prof. Dr. F. Kaudewitz für die Möglichkeit diese Arbeit am Institut f. Genetik der Universität durchführen zu können. Herrn Prof. Dr. W. Klingmüller danke ich für die Anleitung und großzügige Förderung, die er mir bei dieser Arbeit zukommen ließ.

Frl. H. Gagger danke ich für ihre gewissenhafte Assistenz bei einem Teil der Experimente, ferner Frl. D. Sell und Frau R. Reimer für ihre Hilfe bei der Anfertigung der Abbildungen und Photographien, sowie Herrn W. Strobel für die präzise Herstellung des Ultrafiltrationsgerätes nach Paulus.

Lebenslauf:

Ich wurde am 4.10.1944 als Sohn des Schneidermeisters Alfons Hack und seiner Frau Maria in Absdorf / Niederbay. geboren. Von 1950 an besuchte ich die Volksschule in Arnstorf, von dort wechselte ich auf das humanistische Gymnasium in Passau, wo ich 1965 das Abitur ablegte. Anschließend studierte ich an der Ludwigs-Maximilians-Universität München Biologie und Chemie. In diesen Fächern bestand ich 1970 das Staatsexamen für das höhere Lehramt. In den folgenden Jahren bis 1973 arbeitete ich unter Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Klingmüller an vorliegender Arbeit am Institut für Genetik der Universität. Im Februar 1974 begann ich als Studienreferendar meinen Vorbereitungsdienst für das höhere Lehramt.

